

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína
Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Kristýna Kubíčková

Úloha oxidačního stresu v jaterní kancerogenezi

The role of oxidative stress in hepatocarcinogenesis

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce / Školitel: Prof. MUDr. Libor Vitek, Ph.D., MBA

Školitel / Konzultant: Prof. MUDr. Petr Urbánek, CSc.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 8. července 2020

Kristýna Kubíčková

Podpis

Identifikační záznam: KUBÍČKOVÁ, Kristýna. *Oxidační stres a jaterní kancerogeneze* [*The oxidative stress and hepatocarcinogenesis*]. Praha, 2020. 106 s. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky. Vedoucí práce Vítek, Libor.

Poděkování

Ráda bych v první řadě poděkovala svému školiteli prof. Liboru Vítkovi Ph.D., MBA za trpělivost a laskavé vedení v průběhu mého studia. Dále také prof. Petru Urbánkovi CSc. za uvedení do klinické praxe a zaměření mého zájmu k hepatologii jako takové.

Celému kolektivu z Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK v Praze, jmenovitě paní Ing. Ivě Subhanové Ph.D. a Mgr. Janě Jašprové Ph.D., bych chtěla poděkovat za přátelský a vstřícný přístup, cenné rady a pomoc se všemi mými dotazy.

A v neposlední řadě panu Mgr. Petru Koubkovi za prvotní nasměrování k přírodním vědám a za inspiraci ke studiu medicíny.

OBSAH

1	SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY.....	12
1.1	Hepatocelulární karcinom	12
1.1.1	Epidemiologie	12
1.1.2	Etiologie a rizikové faktory HCC.....	13
1.1.3	Screening a surveillance.....	15
1.1.4	Klasifikace.....	20
1.1.5	Diagnostika.....	21
1.1.6	Terapie.....	22
1.1.6.1	Stádium 0.....	23
1.1.6.2	Stádium A.....	23
1.1.6.3	Stádium B.....	24
1.1.6.4	Stádium C.....	26
1.1.6.5	Stadium D.....	28
1.2	Oxidační stres.....	29
1.3	Jaterní kancerogeneze	31
1.3.1	Patogeneze jaterní kancerogeneze.....	31
1.3.2	Mechanismy kancerogeneze u nejčastějších etiologických příčin	38
1.3.2.1	Imunitní reakce v kancerogenezi.....	38
1.3.2.2	Kancerogeneze indukovaná infekcí virem hepatitidy B	39
1.3.2.3	Kancerogeneze indukovaná infekcí virem hepatitidy C	40
1.3.2.4	Kancerogeneze indukovaná alkoholem.....	41
1.3.2.5	Kancerogeneze indukovaná NAFLD/NASH	42
1.4	Katabolická dráha hemu.....	44
2	HYPOTÉZY A CÍLE STUDIE.....	47
3	METODICKÁ ČÁST.....	48
3.1	Charakteristika souboru.....	48
3.2	Odběr a uchovávání vzorků.....	49
3.3	Chemikálie	49
3.4	Přístroje	50
3.5	Analytické metody	51
3.5.1	Izolace RNA.....	51
3.5.2	Reverzní transkripce.....	51
3.5.3	Stanovení genové exprese	51
3.5.4	Biochemická analýza.....	52
3.6	Statistická analýza.....	53

4	VÝSLEDKY	54
5	DISKUZE.....	60
6	ZÁVĚR.....	65
7	LITERATURA.....	66
8	PŘÍLOHY.....	88
8.1	Příloha 1	88
8.2	Příloha 2	96
9	SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ	104
9.1	Publikace týkající se tématu dizertační práce	104
9.1.1	Práce v časopisech s IF.....	104
9.1.2	Práce v časopisech bez IF.....	104
9.1.3	Abstrakta v časopisech bez IF	105
9.2	Publikace týkající se jiných témat	106
9.2.1	Práce v časopisech s IF.....	106

ABSTRAKT

Předkládaná práce se zabývá významem oxidačního stresu a katabolické dráhy hemu u jaterní kancerogeneze. Hepatocelulární karcinom (HCC) je nejčastější maligní nádor jater, nejčastěji vznikající v terénu jaterní cirhózy či chronických virových hepatitid. Jaterní kancerogeneze je spojená se zvýšeným oxidačním stresem. Cílem práce bylo stanovit expresi genů zapojených do regulace oxidačního stresu u pacientů s HCC.

Studie byly provedeny na souborech pacientů s HCC ($n = 29$) a zdravých kontrolních jedincích ($n = 11$), kdy byly stanoveny genové exprese hemoxygenázy (*HMOX1*), biliverdinreduktázy A a B (*BLVRA/B*), endoteliálního růstového faktoru (*VEGFA*), NADPH oxidázy 2 (*NOX2*) a proteinu p22 v jaterní tkáni; dále byly stejné genové exprese stanoveny v leukocytech periferní krve (PBL) u pacientů s HCC ($n = 32$) a u zdravých kontrol ($n = 27$).

Exprese *BLVRA* v jaterní tkáni i v PBL byla signifikantně zvýšená u pacientů s nádorovým onemocněním, podobně významně byla zvýšena i exprese *NOX2* v PBL. Významně snížená exprese *VEGFA* byla prokázána v játrech i v PBL pacientů s HCC. Exprese ostatních studovaných genů se u pacientů s HCC a kontrolních jedinců nelišila.

Tato data jsou ve shodě a navazují na výsledky naší předchozí studie provedené u nemocných s chronickou hepatitidou C, u nichž byla exprese *BLVRA* také zvýšena, a navíc byla i prediktorem trvalé virologické odpovědi. Zvýšená exprese *BLVRA* tak představuje pravděpodobně zpětnovazebný mechanismus kontroly zvýšeného oxidačního stresu u pacientů s HCC.

Klíčová slova: hepatocelulární karcinom, biliverdinreduktáza, katabolická dráha hemu, jaterní cirhóza, oxidační stres

ABSTRACT

This thesis focuses on the importance of heme catabolic pathway in hepatic carcinogenesis. Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary malignant liver tumour. It is primarily caused by hepatic cirrhosis or chronic viral hepatitis. Hepatic carcinogenesis is associated with increased oxidative stress. Thus, our study aimed to assess the expression of the genes involved in the homeostasis of oxidative stress in patients with HCC.

The study was performed on patients with primary HCC (n = 29) and control subjects (n = 11), gene expressions of heme oxygenase 1 (*HMOX1*), biliverdin reductase A/B (*BLVRA/B*), endothelial growth factor (*VEGFA*), NADPH oxidase 2 (*NOX2*) and p22phox were analyzed in the liver tissue; the identical gene expressions were analyzed in peripheral blood leukocytes (PBL) in HCC patients (n = 32) and in healthy controls (n = 27).

Expression of *BLVRA* in liver tissue and PBL was significantly increased in cancer patients, as was *NOX2* expression in PBL. Expression of *VEGFA* in liver tissue and PBL was significantly decreased in cancer patients. The expression of the other genes studied did not differ between HCC patients and controls.

These data are consistent with the results of our previous study on patients with chronic hepatitis C, in which *BLVRA* expression was also increased, and was also a predictor of sustained virological response. Thus, overexpression of *BLVRA* is likely to be a feedback mechanism for controlling increased oxidative stress in HCC patients.

Keywords: hepatocellular carcinoma, biliverdin reductase, heme catabolic pathway, liver cirrhosis, oxidative stress

SEZNAM ZKRATEK

AFP	α 1-fetoprotein, alfa-1-fetoprotein
AKT	proteinkináza B
ALA	kyselina δ -aminolevulová
ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
APC	adematózní polypóza kolon (adenomatous polyposis coli)
AST	aspartátaminotransferáza
BCLC	Barcelonská klasifikace (Barcelona Clinic Liver Classification)
BLVRA/B	biliverdinreduktáza A/B
BVR	biliverdin
CAT	kataláza
CCC	cholangiocelulární karcinom
cccDNA	kovalentně uzavřená cirkulární DNA (covalently closed circular DNA)
ctDNA, cfDNA	cirkulující volná nádorová DNA (circulating tumour DNA, cell free DNA)
CDK	cyklin-dependentní kináza
c-Fos	protoonkogen c-Fos
c-Jun	protoonkogen c-Jun
DFS	přežití bez nemoci (disease free survival)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
GGT	gama-glutamyltransferáza
gDNA	genomová DNA
HBV, HCV	virus hepatitidy B, virus hepatitidy C
HCC	hepatocelulární karcinom
HGF	růstový faktor pro hepatocyty (hepatocyte growth factor)
HMOX	hemoxygenáza
HPRT	hypoxantin fosforibosyl transferáza
GPX	glutathionperoxidáza
GR	glutathionreduktáza
GSH/GSSG	glutathion redukována/oxidovaná forma

IGF	inzulínu podobný růstový faktor (insulin-like growth factor)
LPS	lipopolysacharid
MET	epitelo-mezenchymální tranzice
MPO	myeloperoxidáza
mTOR	mammalian target of rapamycin
NAFLD	nealkoholová jaterní choroba (non-alcoholic fatty liver disease)
NADH/NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NASH	nealkoholová steatohepatitida (non-alcoholic steatohepatitis)
NOX	NADPH oxidáza
NRF1	nukleární respirační faktor 1
PBL	periferní leukocyty (peripheral blood leucocytes)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEI	perkutánní injekce ethanolu
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PFS	přežití bez progresu (progression free survival)
PS	stav tělesné výkonnosti (performance status)
OLT	ortotopická transplantace jater
OS	celkové přežití (overall survival)
RB	retinoblastomový protein
RFA	radiofrekvenční ablace
RNA	ribonukleová kyselina
ROS, RONS	reaktivní formy kyslíku, reaktivní formy kyslíku a dusíku (reactive oxygen species, reactive oxygen and nitrogen species)
SOD	superoxiddismutáza
TACE	transarteriální chemoembolizace
TGF	transformující růstový faktor (transforming / tumor growth factor)
TNF	tumor nekrotizující faktor
TTP	doba do progresu (time to progression)
VEGFA	vaskulární endoteliální růstový faktor A

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1	Přehled reaktivních forem kyslíku a dusíku
Tabulka 2	Sekvence primerů pro genovou expresi
Tabulka 3	Základní charakteristiky pacientů s HCC
Tabulka 4	Etiologie jaterního onemocnění u pacientů s HCC
Tabulka 5	Ostatní histologické nálezy mimo HCC
Tabulka 6	Histologické nálezy v necílené jaterní biopsii

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1 Incidence a mortalita HCC v ČR
- Obrázek 2 Sérové koncentrace AFP u všech pacientů s HCC
- Obrázek 3 Sérové koncentrace AFP u kurativního stádia HCC
- Obrázek 4 BCLC klasifikace
- Obrázek 5 Genetické predispozice a vývoj mutací u HCC
- Obrázek 6 Vícestupňový koncept maligní transformace
- Obrázek 7 Přirozený průběh NAFLD / NASH
- Obrázek 8 Katabolická dráha hemu
- Obrázek 9 Genové exprese v játrech
- Obrázek 10 Genové exprese v PBL

1 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

1.1 Hepatocelulární karcinom

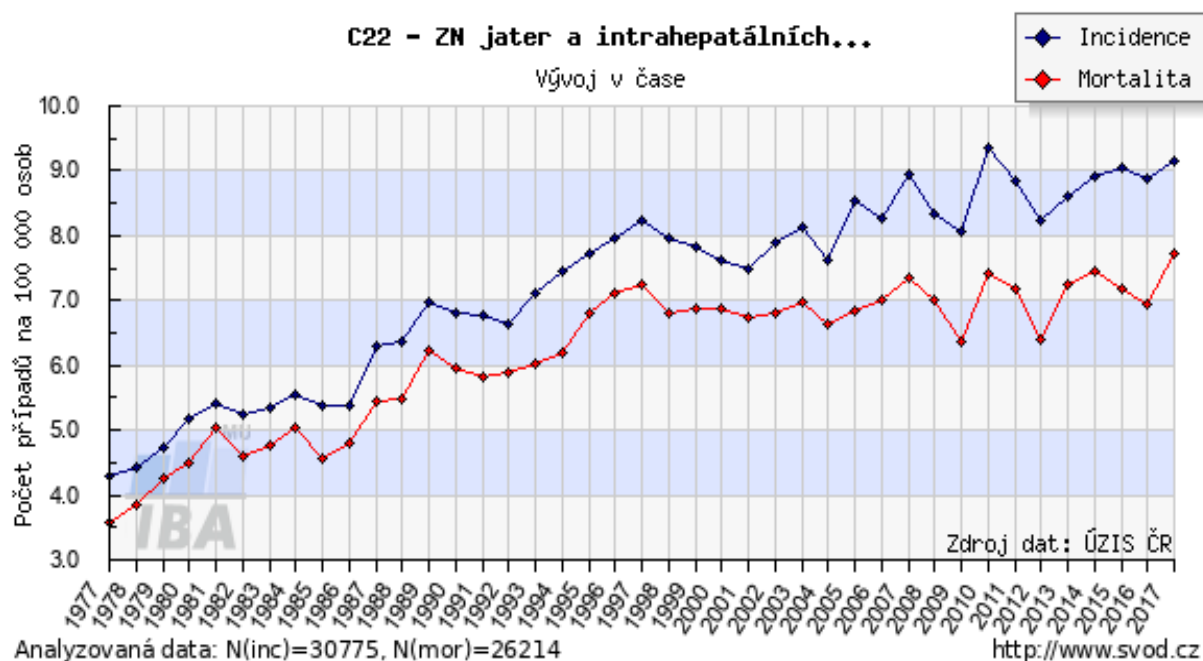
1.1.1 Epidemiologie

Hepatocelulární karcinom (HCC) je nejčastější primární maligní nádor jater. Podle recentních epidemiologických studií je každým rokem celosvětově diagnostikováno odhadem 854 000 nových pacientů s HCC. S počtem 810 000 úmrtí ročně HCC představuje 6. nejčastější nádor a 4. nejčastější příčinu úmrtí na nádorové onemocnění v celosvětovém měřítku (Bray, F., et al., 2018). U mužů se jedná o 5. nejčastější nádorové onemocnění, u žen zaujímá 7. příčku (Torre, L. A., et al., 2015). Průměrný věk v době diagnózy tohoto nádoru je 70 let (El-Serag, H. B., 2012), s častějším výskytem u mužů v poměru 2 - 2,5 : 1 (Ferlay, J., et al., 2015). Incidence HCC má různou geografickou distribuci, rozdílná je také u různých etnických skupin v rámci jedné oblasti. Mezi regiony s vysokým výskytem HCC (tj. více než 15 případů na 100 000 obyvatel za rok) patří subsaharská Afrika, Čína, Hong Kong a Taiwan (de Mochel, N. S., et al., 2010). Naopak Severní a Jižní Amerika a většina Evropy patří mezi země s nízkou incidencí. Avšak i v těchto regionech je nyní pozorován vzrůstající výskyt tohoto onemocnění, stejný trend je očekáván až do období let 2015 - 2020 (Liu, Z., et al., 2019; Llovet, J. M., 2005).

Na základě výsledků velkých epidemiologických studií byla porovnána mortalitní data Světové zdravotnické organizace (World Health Organization, WHO) za období 1990 - 2014. Díky účinné vakcinaci proti viru hepatitidy B (HBV) a dostupnosti protivirové léčby u infekce virem hepatitidy C (HCV) došlo k poklesu mortality na HCC v Asii a jižní Evropě. Naopak v ostatních regionech Evropy a v USA přetrvává nepříznivý trend, kdy se na incidenci a mortalitě HCC podílí i jiná jaterní onemocnění než chronické virové hepatitidy, jako je například stoupající počet obézních pacientů s metabolickým syndromem a konzumace alkoholu (Bertuccio, P., et al., 2017). Podrobněji o jednotlivých etiologických faktorech bude pojednáno dále.

Incidence v České republice dle recentních epidemiologických údajů je udávána do 9 případů na 100 000 obyvatel za rok, přičemž tento počet hlášených případů pod diagnózou C22 dle MKN klasifikace zahrnuje nejen HCC ale i nádory intrahepatálních žlučových cest (Dusek, L., et al., 2014).

Obrázek 1: Incidence a mortalita HCC v ČR



Na grafu incidence a mortality do roku 2017 je patrný trvalý nepříznivý paralelní průběh křivek, což zjednodušeně znamená, že každý rok zemře na HCC přibližně stejný počet pacientů, jako je počet nově diagnostikovaných pacientů s HCC.

1.1.2 Etiologie a rizikové faktory HCC

Jedná se o maligní onemocnění, které v téměř 90 % případů vzniká v terénu jaterní cirhózy. V 10 % případů se nádor vyskytuje mimo jaterní cirhózu, především v terénu nealkoholové steatohepatitidy (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) a chronické HBV infekce.

Riziko vzniku HCC je rozdílné u jednotlivých jaterních onemocnění. Mezi onemocnění s vysokou incidencí HCC patří HBV a HCV infekce. V celosvětovém měřítku má stále ještě více než 50 % pacientů s HCC chronickou virovou hepatitidu B či C, přestože za posledních 20 - 25 let došlo k významnému poklesu počtu pacientů s HCC vznikajícího v terénu chronických virových hepatitid. Například práce publikovaná v roce 2006 uváděla podíl HBV a HCV na vzniku HCC přes 80 % celosvětově (Perz, J. F., et al., 2006). V relativně krátkém časovém horizontu lze pozorovat tento klesající trend, způsobený především plošnou vakcinací proti HBV infekci a úspěšnou protivirovou léčbou hepatitidy C přímo působícími antivirovými látkami.

U pacientů s HBV infekcí je dokumentováno až 100krát vyšší riziko rozvoje HCC, který může vzniknout v jakémkoliv stadiu infekce a jaterního poškození (Beasley, R. P., et al., 1981;

Sherman, M., 2009). U pacientů s HCV je riziko vzniku HCC 17krát vyšší ve srovnání se zdravou populací (de Oliveria Andrade, L. J., et al., 2009), na rozdíl od HBV infekce se nádor vyvíjí v terénu jaterní cirhózy, v precirhotickém terénu vzácně (De Mitri, M. S., et al., 1995). U cirhózy na podkladě HCV infekce je roční incidence HCC 1 – 8 % (Hoshida, Y., et al., 2014), v průběhu 10 letého sledování pacientů s cirhózou C v japonské populaci byla kumulativní incidence HCC 53 % (Ikeda, K., et al., 1993). U úspěšně vyléčených osob dochází k redukci rizika vzniku HCC o 76 % (White, D. L., et al., 2017), v průběhu 8 letého sledování pacientů s dosaženou setrvalou virologickou odpovědí (SVR) byla kumulativní incidence HCC 1,8 % v terénu pokročilé fibrózy, respektive 8,7 % u cirhotiků (van der Meer, A. J., et al., 2017). Mezi choroby s vysokou incidencí HCC patří dále hereditární hemochromatóza, primární biliární cholangitida a α 1-antitrypsin deficeience ve stádiu jaterní cirhózy (Bruix, J., et al., 2011).

K onemocněním se střední incidencí HCC patří nadměrný příjem alkoholu (Mancebo, A., et al., 2013). V Evropě je alkohol etiologickým faktorem vzniku 40 – 50 % HCC (Jewell, J., Sheron, N., 2010), s ubýváním výskytu virových hepatitid lze očekávat, že nadměrná konzumace alkoholu bude vedoucí příčinou vzniku HCC v rozvinutých zemích. Podle recentně publikované epidemiologické studie, analyzující mortalitu na HCC celosvětově a v jednotlivých zemích, je HCC v terénu etylické jaterní cirhózy příčinou úmrtí u 30 % pacientů v celosvětovém měřítku. Abusus alkoholu má samozřejmě různou geografickou distribuci, dvěma protipóly jsou v tomto případě Bělorusko (63 % případů HCC způsobených alkoholem) versus Irán (6 % případů HCC způsobených alkoholem). Na základě těchto recentních dat se tedy virové hepatitidy a abusus alkoholu podílí na vzniku celkem 84 % všech případů HCC (hepatitida B 33 %, alkohol 30 %, hepatitida C 21 %) (Global Burden of Disease Liver Cancer, C., et al., 2017). Tito pacienti často unikají včasné diagnóze alkoholové jaterní cirhózy a ve srovnání s např. HCV infekcí je jich významně menší procento zařazeno do screeningu HCC (Colombo, M., Maisonneuve, P., 2017).

Mezi další významné rizikové faktory významně se podílející na incidenci HCC patří nealkoholová jaterní choroba (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD), respektive NASH (Caldwell, S. H., et al., 2004). V budoucnu se dá předpokládat, že vzhledem k celosvětově epidemicky narůstající prevalenci obezity bude právě NAFLD/NASH jedním z hlavních rizikových faktorů vzniku HCC. Podle některých odhadů je v USA a Kanadě až 1/3 populace obézních, to by znamenalo odhadem 112 miliónů lidí, u nichž se v určitém procentu v průběhu života může rozvinout chronické jaterní onemocnění s následným vznikem HCC. Některé studie tak předpokládají až 1,7 milionů nových případů onemocnění v této populaci v následujících dekádách (Sherman, M., 2017). Kumulativní roční incidence HCC u pacientů

s NASH je 2,4 - 12,8 % (White, D. L., et al., 2012). U většiny NAFLD/NASH asociovaných HCC dochází ke stanovení diagnózy v pokročilých stádiích, jak již bylo zmíněno výše, často k tomu dochází bez přítomné cirhózy. Problematická je tedy už samotná identifikace rizikových pacientů a jejich zařazení do screeningů (Piscaglia, F., et al., 2016). Toto je jedna z mnoha příčin obecně špatné prognózy pacientů s HCC v terénu NASH, dále k tomu přispívá obezita a další komorbidita, především kardiovaskulární. V konečném důsledku to vede i mnohem menšímu podílu kurativních metod léčby u těchto pacientů (Younossi, Z. M., et al., 2015).

Pro kompletní přehled mezi další dokumentované rizikové faktory vzniku HCC patří také kouření (Trichopoulos, D., et al., 2011), expozice aflatoxinům se významně podílí na incidenci HCC především v Africe a Asii, významná je především u HBV infikovaných jedinců. U dalších onemocnění, jako je například autoimunitní hepatitida či Wilsonova choroba, je HCC vzácný (van Meer, S., et al., 2015).

1.1.3 Screening a surveillance

Protože 90 % všech HCC vzniká v terénu jaterní cirhózy, populace ohrožená vznikem HCC je dobře definovatelná. Identifikace rizikové skupiny dále podmiňuje efektivní zavedení optimální screeningové metody. Přitom pouze efektivní screening rizikových skupin může vést k odhalení nádoru v časných fázích jeho vývoje. Bohužel podle dostupných údajů je pouze 30 % pacientů s HCC diagnostikováno v časných stádiích, kdy je možná kurativní léčba (Llovet, J. M., et al., 2008).

Optimální metodou screeningů HCC (tj. vyšetřování předem definované skupiny osob za účelem vyhledávání chorob v jejich časných stádiích, kdy pacient ještě nemá potíže a příznaky) je ultrasonografie jater. Jde o dostupnou a levnou zobrazovací metodu bez radiační zátěže pacienta. Surveillance znamená pravidelné opakování screeningové metody pro danou skupinu pacientů. Efektivní diagnostika pomocí surveillance umožňuje v obecné rovině odhalení nádorů v časných stádiích, kdy je největší šance na použití kurativních metod léčby. V případě HCC může pouze důsledné uplatňování metod surveillance vést k poklesu letality nádoru. K poklesu letality vede pouze kurativní terapie, nikoliv terapie paliativní. U HCC je použití kurativních metod limitováno řadou faktorů, z nichž nejdůležitější je velikost a počet nádorových ložisek.

Doporučenou metodou surveillance HCC je ultrasonografie jater prováděná v 6 měsíčních intervalech (Bruix, J., et al., 2011). Tato doporučení vycházejí z výsledků studie zahrnující více než 18 000 pacientů s chronickou HBV infekcí. Bylo dosaženo významně nižší

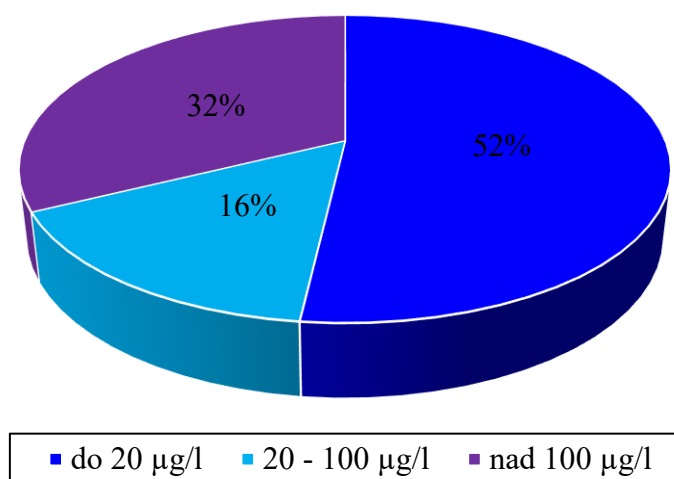
mortality (redukce o 37 %) a delšího přežívání u pacientů podstupujících tato vyšetření než u kontrolní skupiny osob, u nichž nebyla surveillance HCC z různých důvodů prováděna (Zhang, B. H., et al., 2004). Jednoznačným faktorem rozhodujícím o lepší prognóze přitom byla skutečnost, že u skupiny podstupujících surveillance byl nádor odhalen významně častěji v časných stádiích onemocnění. Stejný systém surveillance je aplikován i u pacientů s jinými jaterními chorobami. Pokud bychom však striktně trvali na zásadách evidence based medicine (EBM), jsou u všech ostatních indikací důkazy slabší než pro surveillance u HBV infekce.

Senzitivita ultrasonografie je 65 – 80 %, specifita dosahuje až 90 % (Singal, A., et al., 2009). Vyšetření by mělo být prováděno na pracovišti, kde jsou zkušenosti s hodnocením změn v cirhotickém terénu. Rozpoznání ložiskových změn od velko- či malouzlové přestavby jater je náročné. Optimální časový interval 6 měsíců byl určen na základě odhadu růstu asymptomatického HCC do doby jeho diagnózy (Sheu, J. C., et al., 1985). S ohledem na velkou variabilitu mezi jednotlivými klinickými případy je např. v Japonsku interval surveillance zkrácen na 3 měsíce (Makuuchi, M., et al., 2008). Dle výsledků jedné randomizované studie avšak nebyl prokázán rozdíl v zachytu časných malých HCC při surveillance prováděné v intervalu 3 a 6 měsíců (Trinchet, J. C., et al., 2011). Na druhou stranu studie, porovnávající 6 a 12 měsíční interval surveillance, vyzněla ve prospěch kratšího intervalu (Singal, A., et al., 2009). I další studie zabývající se nákladovou efektivitou shledávají půlroční interval jako optimální.

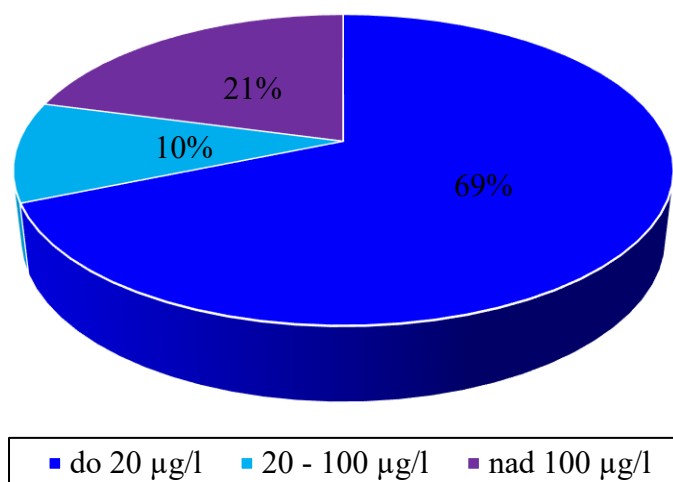
V dřívějších standardech bylo v kombinaci se zobrazovací metodou doporučováno stanovení sérové koncentrace α 1-fetoproteinu (AFP). AFP je glykoprotein ve formě jednoduchého polypeptidového řetězce, funkčně se jedná o fetální albumin. K fyziologickému zvýšení jeho koncentrací dochází v amniové tekutině plodu i plazmě matky, je exprimovaný ve vysoké hladině v embryonálním žloutkovém vaku a ve fetálních játrech. Jeho využití jako onkomarkeru pro HCC má ovšem svoje limity. Hodnota AFP je obvykle zvýšená až u pokročilých nádorů (Sherman, M., 2010), dále může být zvýšená u cholangiocelulárního karcinomu či hemangioendoteliomu jater, jaterních metastáz kolorektálního karcinomu, renálního karcinomu, nádoru žaludku, plic a germinálních tumorů. Z nenádorových onemocnění nacházíme elevované hodnoty typicky u jaterní cirhózy, mimo to také u hereditární tyrosinémie typu I, cystické fibrózy, či ataxia teleangiectasia. Jako raritní stav je popsána tzv. kongenitální AFP perzistence, kdy dochází ke klinicky asymptomatickému zvýšení hodnot AFP bez přítomnosti nádorového onemocnění. Do roku 2010 bylo popsáno 19 rodin na celém světě, u části z nich byl prokázán jednonukleotidový polymorfismus v promotorové oblasti genu *AFP* (Houwert, A. C., et al., 2010).

Kolísající sérové koncentrace AFP u pacientů s chronickým jaterním onemocněním mohou být způsobeny nejenom vznikem HCC, ale také např. dekompenzací jaterní cirhózy (Senturk, H., Cumali, R., 2007) či vzplanutí HBV či HCV infekce (Di Bisceglie, A. M., et al., 2005), naopak pouze 50 % nádorů exprimuje AFP. Hodnota AFP 20 µg/l vykazuje dobrou senzitivitu, ale nízkou specifitu, vyšší cut-off 200 µg/l má vysokou specifitu, ale senzitivita klesá na 22 % (Trevisani, F., et al., 2001). Data z mnoha prací poukazují na fakt, že v době diagnózy má více než 30 - 50% pacientů s HCC normální hladiny AFP (Colombo, M., 2001) a pouze malé procento pacientů s HCC v časném stadiu má elevované hodnoty AFP. Z těchto důvodů je AFP jako screeningový test nevhodný. Toto je v souladu se zkušenostmi z našeho pracoviště, kdy v souboru 180 pacientů s již diagnostikovaným HCC mělo 52 % pacientů hodnoty AFP do 20 µg/l, pokud jsme jako cut-off brali hodnotu do 100 µg/l, bylo to 68 % pacientů. V souladu s výše uvedenými údaji mělo téměř 70 % pacientů v časném tj. kurativním hodnoty AFP do 20 µg/l, při cut-off do 100 µg/l se pak jednalo o téměř 80 % pacientů (Obrázek 2 a Obrázek 3).

Obrázek 2: Sérové koncentrace AFP u všech pacientů s HCC



Obrázek 3: Sérové koncentrace AFP u kurativního stádia HCC



Podle jedné studie kombinace dvou metod screeningu (ultrasonografie jater + odběr AFP) zvyšovala záchyt HCC pouze v 6 – 8 % případů nezachycených ultrasonografií (Biselli, M., et al., 2015). Kombinaci těchto metod nelze doporučit u většiny onemocnění s aktivitou zánětu v játrech, kdy dochází k nárůstu falešně pozitivních výsledků a zvyšuje se cena prováděné surveillance (Singal, A., et al., 2009; Zhang, B., Yang, B., 1999).

Role AFP ve screeningu a i v diagnostice HCC tak zůstává kontroverzní – dle doporučených postupů Americké asociace pro studium jater (AASLD) z roku 2010 byl odběr AFP vyřazen z diagnostických kritérií (Bruix, J., et al., 2011), ve shodě s guidelines Evropské asociace pro studium jater (EASL) z roku 2012 (EASL-EORTC, 2012).

Aktuální doporučené postupy EASL i AASLD publikované v roce 2018 se k přínosu AFP staví poněkud smířlivěji (Galle, P. R., et al., 2018; Heimbach, J. K., et al., 2018). Ultrasonografie je sice nadále brána jako optimální metoda surveillance HCC s nejvyšší úrovní kvality důkazů, ale je zde prostor k využití AFP k diagnostice časného HCC v případech dobře léčeného a kompenzovaného jaterního onemocnění, ovšem nejsou k dispozici dostatečné výsledky klinických studií.

Další diagnostické markery HCC

Další markery jsou předmětem intenzivního výzkumu, jedná se především o následující serologické markery:

a. PIVKA II (protein induced by vitamin K absence/antagonist-II) alias DCP (des- γ -karboxyprotrombin)

Tato abnormální protrombinová molekula je produkována v důsledku defektu v posttranslační karboxylaci protrombinového prekurzoru v maligních buňkách (Stenflo, J., et al., 1974). Podle jedné studie má DCP při cut-off hodnotě 125 mAU/ml vyšší senzitivitu a specifitu než AFP při cut-off 11 ng/ml pro odlišení HCC od změn v terénu chronického jaterního onemocnění (senzitivita 89 % vs. 77 % a specifita 95 % vs. 73 %) (Marrero, J. A., et al., 2003). Ovšem lepší výsledky poskytuje až u větších HCC (více než 5 cm v průměru) v porovnání s AFP, u kterého je naopak lepší diagnostika lézí do velikosti 3 cm (Nakamura, S., et al., 2006). K využití pro surveillance HCC se tedy nehodí, navíc využití toho markeru v rutinní praxi omezuje jeho falešně pozitivní zvýšení hodnot u deficiencie vitamínu K při jaterní insuficienci či při užívání antagonistů vitamínu K. Vzhledem k tomu, že vysoké hodnoty DCP jsou spojeny s agresivitou nádoru a vaskulární invazí, jeho klinickým využitím by mohla být predikce chování tumoru či využití při selekci vhodných kandidátů transplantace jater (Inagaki, Y., et al., 2011).

b. glypican-3

Tento proteoglykan je součástí plasmatické membrány, váže se s některými růstovými faktory a moduluje jejich aktivitu. Za fyziologických podmínek detekovatelný ve fetálních játrech nikoliv ve zdravých játrech dospělých (Zhou, F., et al., 2018). Podle několika studií ovšem ve srovnání s AFP neposkytuje vyšší záchyt HCC, v kombinaci s AFP zvyšuje senzitivitu (Capurro, M., et al., 2003; Xu, C., et al., 2013).

c. AFP L3 (*Lens culinaris* agglutinin-reactive glycoform of AFP)

Jedná se o jednu ze tří frakcí AFP, jež se rozděluje podle afinity k aglutininu *Lens culinaris* (čočka jedlá). Má nižší senzitivitu než AFP, jeho kombinace s AFP nezvyšuje záchyt HCC (Park, S. J., et al., 2017). Je diskutován v dlouhodobém sledování efektu transarteriální chemoembolizace (TACE), kdy poskytuje pravděpodobně lepší predikci progresu HCC po TACE než AFP (Huang, C., et al., 2014), recentně také publikovány práce, které prokazují jeho význam v časně detekci rekurence HCC po radiofrekvenční ablacii (Shawky Elsawabi, A., et al., 2019).

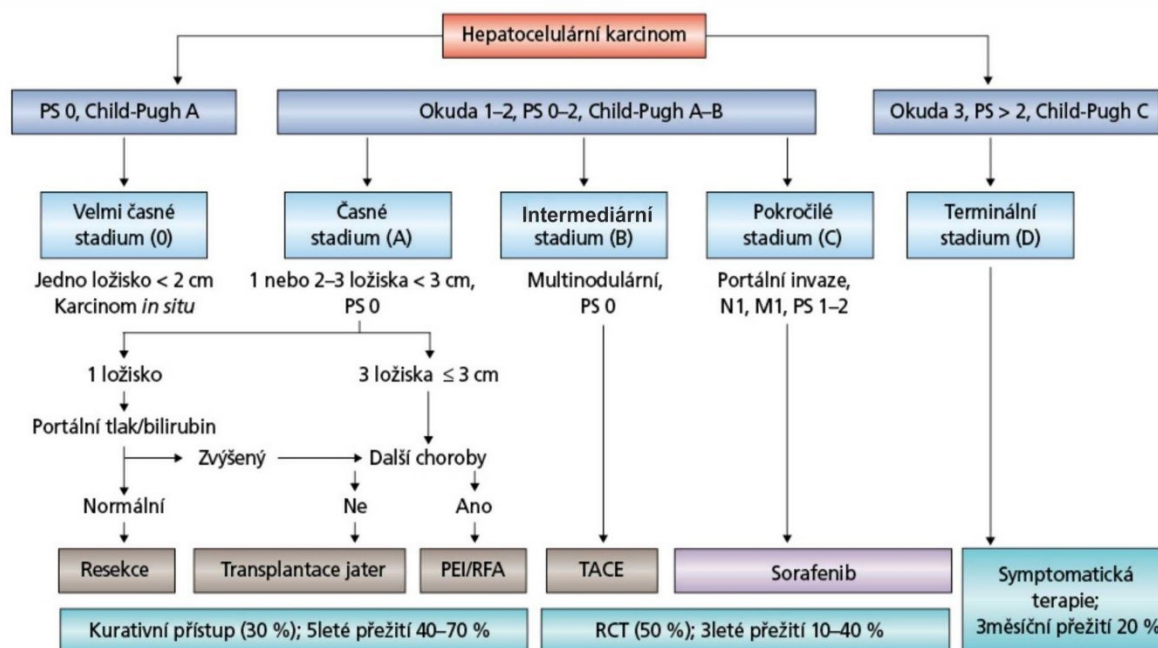
Z výše uvedeného vyplývá, že žádný z uvedených markerů nemá prozatím význam pro screening v rutinní praxi. Lze ovšem předpokládat, že jednotlivé markery by mohly mít rozdílné

využití pro různé klinické situace – kromě vlastní surveillance a diagnostiky by se tak mohlo jednat např. o záchyt časně recidivy HCC po resekci (metabolomické profilování) či predikci odpovědi na léčbu (stanovení určité genové exprese k zavedení tzn. personalizované terapie). Dalším biomarkerem by mohlo být stanovení cirkulující volné nádorové DNA, (circulating tumour DNA, ctDNA; označované též cell free DNA, cfDNA) v periferní krvi, tzv. „liquid biopsy“. Vzhledem k výrazné genomové heterogenitě HCC (bude diskutováno níže) je stanovení ctDNA u HCC obtížnější než například u kolorektálního karcinomu, ale i tak je její analýza komplexnější než biopsie nádorové tkáně. Výhodou je také snadnější získání materiálu oproti cílené biopsii nádoru, tím pádem snadné monitorování přítomnosti ctDNA v průběhu terapie a po ukončení terapie, kdy může zachytit eventuální recidivu ještě při negativním výsledku zobrazovacích metod. Recentní práce ukazují, že analýza ctDNA by mohla posloužit jako nezávislý prognostický faktor ke stratifikaci pacientů s HCC a k predikci průběhu onemocnění (Xu, R. H., et al., 2017).

1.1.4 Klasifikace

V klinické praxi je nejpoužívanějším systémem tzv. Barcelonská klasifikace (Barcelona Clinic Liver Cancer Classification, BCLC) (Llovet, J. M., et al., 2008) (Obrázek 4), na základě které můžeme komplexně zhodnotit stav pacienta a volit nejlepší možnou léčebnou strategii. Tento systém zahrnuje nezávislé faktory přežití – počet a velikost ložisek, funkční klasifikaci jaterní cirhózy dle Child-Pugh, Okudovu prognostickou klasifikaci, dále přítomnost portální invaze a zhodnocení celkového stavu pacienta (performance status, PS). Dle stadia HCC by měla být použita optimální léčebná modalita (viz dále).

Obrázek 4: BCLC klasifikace



PEI – perkutánní injekce ethanolu, PS – performance status, RCT – randomizované kontrolované studie

RFA – radiofrekvenční ablace, TACE – transarteriální chemoembolizace

Upraveno podle (Llovet, J. M., et al., 2008).

1.1.5 Diagnostika

Pokud v rámci pravidelné surveillance nalezneme ložiskové změny jater, pacient podstupuje další vyšetřovací proces. Dříve byla pro definitivní diagnózu HCC vyžadována kombinace dvou zobrazovacích metod nebo kombinace jedné zobrazovací metody a zvýšené hodnoty AFP. V současné době je pro diagnostiku HCC v terénu jaterní cirhózy doporučována neinvazivní zobrazovací vyšetření (Bruix, J., et al., 2011). V případě, že se jedná o ložisko menší než 1 cm, doporučuje se opakování ultrasonografie v čtyřměsíčním intervalu, pokud se ložisko po dobu 12 měsíců nezvětšuje, provádí se nadále kontroly ve standardním 6 měsíčním intervalu (Llovet, J. M., Bruix, J., 2003). U ložiskových změn větších než 1 cm se doplňuje 4 fázové CT (nativní, arteriální, venózní, pozdní) či dynamická MRI s použitím kontrastní látky. Provedení kontrastní sonografie (CEUS) není standardně doporučováno pro falešně pozitivní výsledky (např. u cholangiocelulárního karcinomu) (Vilana, R., et al., 2010). V cirhotickém terénu k diagnóze HCC stačí jedna ze dvou výše uvedených zobrazovacích

metod, takzvaný „typický radiologický znak HCC“ je založen na chování kontrastní látky v bohatě cévně zásobeném nádoru. Signifikantní je arteriální hypervaskularizace s rychlým vymýváním (fází wash-out) ve venózní či pozdní fázi (Matsui, O., et al., 2011). Neinvazivní kritéria neplatí pro ložiskové léze v necirhotickém terénu – v tomto případě je vždy vyžadováno provedení jaterní biopsie.

V případě nepřítomnosti typického obrazu HCC na CT či MRI je doporučována cílená biopsie. V případě těchto malých lézí ani biopsie není vždy rozhodující pro definitivní diagnózu. Může být falešně negativní i falešně pozitivní, např. v případě dysplastických uzlů. V případě nekonkluzivní histologie je doporučována včasější kontrola v čtyřměsíčním intervalu či opakování biopsie. Opakování biopsie je vždy indikováno v případě růstu ložiska či změny jeho vzhledu na zobrazovacích metodách (Forner, A., et al., 2008). Komplikací cílené biopsie může být krvácení, mírné (ve 3 – 4 % případů) či závažné vyžadující krevní převody (do 0,5 % případů) (Rockey, D. C., et al., 2009). Další komplikací může být vznik implantačních metastáz v punkčním kanálu, dle metaanalýzy s četností vzniku až v 2,7 % případů (Silva, M. A., et al., 2008). Další publikované práce ovšem ukázaly, že tyto metastázy lze léčit chirurgicky či radiointervenčně bez následného ovlivnění celkového přežívání (Fuks, D., et al., 2014).

1.1.6 Terapie

Jak už bylo zmíněno výše, pro klasifikaci HCC je nejčastěji používána BCLC klasifikace, která současně stanovuje optimální léčebnou strategii. V tomto je jedinečnost BCLC klasifikace, protože žádný jiný klasifikační systém nemá přímou vazbu na ověřený terapeutický postup. Část pacientů v určitém stadiu nemusí splňovat všechna kritéria nebo může dojít k selhání optimální léčebné metody. V tomto případě by měla být zvolena alternativní léčba z následujícího stádia (Raoul, J. L., et al., 2018). Léčba HCC je vždy multidisciplinární, kromě hepatologa se na ní podílí chirurg, transplantolog, intervenční radiolog a onkolog. Terapie by měla probíhat na pracovištích, která jsou schopna poskytnout komplexní péči včetně metod intervenční radiologie. Toto nádorové onemocnění má velmi nepříznivou prognózu, kdy 5 leté přežití napříč všemi stádii je 12 % (El-Serag, H. B., 2011); 6 měsíční přežití u stadia D při terminální jaterní cirhóze dokonce pouze 5 % (Llovet, J. M., et al., 2000). Přežití pacientů s neléčeným HCC je 3 – 6 měsíců v závislosti na stadiu onemocnění (Khalaf, N., et al., 2017). Terapeutické postupy by měly vést k prodloužení doby přežití nad tento horizont.

Terapie jednotlivých stádií dle BCLC klasifikace

1.1.6.1 Stádium 0

Jedná se o velmi časně stadium, někdy též nazývané carcinoma *in situ*. Ve velkých souborech pacientů toto stádium tvoří kolem 5 – 10 % všech pacientů s HCC, v Japonsku v důsledku pečlivého uplatňování surveillance až 30 % (Farinati, F., et al., 2009; Kokudo, N., et al., 2015). Pokud nejsou přítomny známky portální hypertenze (klinicky nebo při katetrizaci jaterních žil) či není zvýšený bilirubin, je indikována primární chirurgická resekční léčba. V případě, že je takto malé ložisko zjištěno u pacienta s dobře kompenzovanou jaterní cirhózou, metodou volby je ortotopická transplantace jater (OLT). OLT je indikována i u pacientů, kteří mají známky portální hypertenze či hyperbilirubinémii a splňují další kritéria OLT (viz dále) (Llovet, J. M., et al., 2008). U pacientů neúnosných k chirurgickému výkonu je indikováno provedení kurativní radiofrekvenční ablace tumoru (RFA) se srovnatelným přežíváním pacientů (Cucchetti, A., et al., 2013).

1.1.6.2 Stádium A

Tato skupina osob se dále stratifikuje v závislosti na komorbiditách pacienta. Pokud pacient není významně komorbidní, je nutno uvažovat o chirurgické resekcii či OLT. Rozhodujícím hlediskem i v tomto stádiu je přítomnost portální hypertenze. Transplantace jater z indikace HCC představuje jedno z nejrychleji se rozvíjejících témat v dané oblasti. Základním a prvním systémem používaným pro indikaci pacientů s HCC k transplantaci byla tzv. Milánská kritéria. Podle nich je transplantace indikována u pacientů majících jedno nádorové ložisko průměru do 5 cm či tři ložiska do průměru 3 cm (Mazzaferro, V., et al., 1996). Další vývoj ukázal, že podle těchto kritérií je transplantace kontraindikována i u pacientů s pokročilejším onemocněním, kteří by z transplantace jater mohli profitovat. Proto vznikla řada dalších systémů, například rozšířená Milánská kritéria, kritéria UCSF, up-to-seven kritéria apod. Různá transplantační centra používají v závislosti na lokálních podmínkách různé systémy (Oliverius, M., et al., 2007). V této souvislosti je třeba zdůraznit, že jakékoliv rozšíření kritérií (směrem k pokročilejšímu HCC) vede k poklesu přežívání po výkonu v důsledku častějších recidiv nádorového onemocnění. Zároveň dochází k vyčerpávání nabídky štěpů.

Pokud je OLT kontraindikována (např. z důvodů věku či celkových komorbidit) je alternativní kurativní terapií pro skupinu pacientů stádia A RFA či perkutánní injekce ethanolu (PEI). Na rozdíl od RFA lze PEI použít u některých ložisek, která jsou k ošetření pomocí RFA

nevhodná (uložení u velkých cév či v blízkosti žlučníku), nevýhodou je nutnost opakování výkonu k dosažení destrukce nádoru. Dle dostupných studií je lepší přežití u pacientů, kteří podstoupili RFA než PEI. Zřejmě i proto, že při RFA je lepší odhad velikosti vzniklé nekrózy tumoru (Bruix, J., et al., 2011).

Výše uvedené léčebné modalitty pro stádium 0 a A, tj. chirurgická resekce, OLT, RFA a PEI je možno považovat za kurativní. Z celého počtu pacientů s HCC postoupí kurativní léčbu asi 30 % pacientů, odhad 5 letého přežití je 40 - 70 % (de Lope, C. R., et al., 2012).

1.1.6.3 Stádium B

U pacientů v tomto stádiu HCC je nález neresekabilní a pacienti jsou indikováni k paliativním metodám terapie. K nim je řazena především transarteriální choemoembolizace jater (TACE).

Principem TACE je kombinace ischemizace ložiska s lokálním podáním chemoterapeutika cestou vyživující tepny nádoru. V současnosti je dostupná konvenční TACE (c-TACE), což je chemoembolizace emulzí lipiodolu s chemoterapeutikem, v případě DEB-TACE je chemoterapeutikum (doxorubicin) navázáno na mikrosféry z hydrogelu, tzv. drug-eluting beads. Výkon je prováděn z femorálního přístupu, při jedné etapě výkonu je podáno 50-100 mg doxorubicinu. Tímto způsobem je dosaženo vysoké lokální koncentrace cytostatika, výsledný efekt je potencován ischemizací nádoru (Malagari, K., 2008). Hodnocení efektu výkonu se provádí pomocí CT či MR s použitím modifikovaných RECIST kritérií (mRECIST = modified response evaluation criteria in solid tumors) v odstupu 1 – 3 měsíců po výkonu, při reziduálním tumoru je možné provést další etapu chemoembolizace.

Kontraindikací TACE je omezení portálního toku (trombóza portální žíly, neošetřitelné AV zkraty, hepatofugální tok krve), extrahepatální šíření, pokročilé renální selhání (clearance kreatininu < 30 ml/s), dekompenzace jaterní cirhózy (Child-Pugh > 7b, ascites) a klinické příznaky terminálního nádorového onemocnění (Bruix, J., et al., 2011). Komplikace jsou jednak vaskulární, mezi něž patří poranění tepny v místě vstupu, spasmus, trombóza či disekce hepatické tepny (Yoon, D. Y., et al., 1995) a nezacílená embolizace, např. včetně plicní embolie (Chung, J. W., et al., 1993). Mezi nevaskulární komplikace patří vznik bilomu, jaterního abscesu a nejčastější komplikace tzv. postchemoembolizační syndrom. Tato komplikace se vyskytuje u 90 % pacientů po TACE (Clark, T. W., 2006), projevuje se horečkou, bolestmi v pravém podžebří, nauzeou, v laboratorních odběrech dochází k elevaci jaterních testů a zánětlivých parametrů. Četnost jaterních abscesů po TACE je dlouhodobě ve velkých

souborech pacientů udávána mezi 0,2 – 0,34 % (Song, S. Y., et al., 2001; Sun, W., et al., 2017). Riziková jsou zejména pacienti s biliodigestivní chirurgickou spojkou či se zavedeným biliárním stentem.

Tato metoda vede k významnému prodloužení doby přežití pacientů, což bylo prokázáno na základě výsledků dvou klinických studií (Llovet, J. M., et al., 2002; Lo, C. M., et al., 2002) a metaanalýzy (Llovet, J. M., Bruix, J., 2003) s mediánem přežití 20 měsíců. V našem souboru je medián přežití 21 měsíců, což je srovnatelné s výsledky velkých studií. Při selekci pacientů dle ART skóre (Assessment for Retreatment with TACE), což je skórovací systém hodnotící efektivitu první etapy TACE, byl medián 33 měsíců (Hribek, P., et al., 2016; Sieghart, W., et al., 2013). Byly též publikovány výsledky kohortových studií přísně selektovaných pacientů, kde medián přežití dosahuje až 40 měsíců (Burrel, M., et al., 2012). Medián přežití neléčených pacientů v tomto stádiu je udáván 9,5 až 16 měsíců (Khalaf, N., et al., 2017; Llovet, J. M., Bruix, J., 2003). Tato skupina je z celé BCLC klasifikace nejvíce heterogenní - zahrnuje pacienty jen těsně překračující kritéria pro transplantaci i pacienty s multifokálním bilobárním postižením a pokročilou jaterní cirhózou, což má za následek rozdíly v celkovém přežití pacientů. V budoucnu tak lze předpokládat rozdělení této skupiny v rámci BCLC klasifikace.

Další alternativní intervenční metodou je tzv. radioembolizace (TARE). Vychází ze stejného principu jako TACE, ale transarteriálně se podává venookluzivní materiál s navázaným radionuklidem. Nejčastěji se jedná o yttrium 90 (Hilgard, P., et al., 2010). Tato metoda je vhodná zejména u pacientů s trombózou portální žíly, u kterých je TACE kontraindikovaná. V porovnání se sorafenibem nebylo dosaženo superiority, tzn. v tomto případě nebyl rozdíl v celkovém přežívání, ačkoliv u pacientů léčených pomocí TARE došlo ke zmenšení nádoru a prodloužení doby do progresu (time to progression, TTP) (Chow, P. K. H., et al., 2018; Vilgrain, V., et al., 2017). Přímé porovnání těchto dvou metod naráží na malé soubory pacientů, dle dostupných výsledků TARE signifikantně prodlužuje TTP s lepší kvalitou života, ale bez změny celkového přežívání (overall survival, OS) ve srovnání s TACE (Salem, R., et al., 2016). Před samotným výkonem je zapotřebí vyloučit přítomnost významného průtokového zkratu do plic provedením perfuzní jaterní scintigrafie pomocí Tc-99m značeného makroagregovaného albuminu. Takto připravený albumin obsahuje částice o velikosti 10 – 100 μm , které při této velikosti nepronikají plicním parenchymem, ale zůstávají dočasně zachyceny v průsvitu kapiláry. Je-li průtok krve plícemi normální, rozprostře se sloučenina v oblastech plic podle fyziologických gradientů. Celkově se tak jedná o metodu

náročnou nejen technicky, ale také personálně (vzhledem k nutnosti manipulace s čistým beta zářičem), proto není tak rozšířená a dostupná jako TACE.

1.1.6.4 Stádium C

U těchto pacientů je přítomna angionvaze či extrahepatální šíření. Terapií volby je v tomto případě systémová onkologická léčba. HCC patří mezi nejvíce chemorezistentní nádory, do roku 2007 nebyla k dispozici žádná systémová terapie. V problematice používání systémové chemoterapie u HCC se názorně ukazuje, že se jedná o dvě onemocnění – vlastní nádora komplikující jaterní cirhózu. Jaterní insuficience má vliv na transformaci xenobiotik, kdy se zvyšuje toxicita podávaných léčiv. Další komplikací jsou systémové infekce doprovázející chemoterapii, které mohou být pro imunokompromitované cirhotiky fatální.

V současné chvíli je v běžné klinické praxi nepoužívanější perorální preparát sorafenib. Patří mezi novou generaci protinádorových léčiv představující tzv. cílenou molekulární léčbu. Jedná se o multikinázový inhibitor, inhibuje tyrozinkinázy a serin/threoninkinázy receptorů mnoha růstových faktorů jako jsou například receptory pro vaskulární endoteliální růstové faktory (VEGFR 2-3), receptory růstových faktorů pro fibroblasty (FGFR) a či receptory pro růstový faktor pro krevní destičky β (PDGFR β). Jeho mechanismem účinku je tedy především inhibice receptorů působících v procesu angiogeneze (Hicklin, D. J., Ellis, L. M., 2005). Celková denní dávka je 800 mg p.o. rozdělená do dvou dávek. Nejčastějšími nežádoucími účinky jsou průjem, vyrážka, alopecie a kožní reakce na dlaních a chodidlech (syndrom palmoplantární erytrodysestezie) (Bhojani, N., et al., 2008). Účinnost tohoto preparátu byla potvrzena v klinické studii SHARP (Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol) (Llovet, J. M., et al., 2008), která zahrnovala 602 pacientů s pokročilým HCC bez předchozí léčby. Z toho 299 pacientů bylo léčených sorafenibem (ve výše uvedené celkové dávce 800 mg) a 303 pacientů užívalo placebo. Medián celkového přežití (OS) byl 10,7 měsíců v léčené skupině a 7,9 měsíců ve skupině neléčené ($p < 0.0001$). Na základě těchto výsledků je sorafenib považován lék první volby pro pokročilý HCC, dlouhodobě byl též jediný dostupný zástupce systémové terapie v první linii léčby.

Zcela novou léčivou látkou s prokázaným účinkem pro léčbu HCC je lenvatinib. Jedná se o inhibitor receptorové tyrosinkinázy, který selektivně inhibuje kinázovou aktivitu VEGFR 1-3, FGFR1-4 a PDGFR α (Matsui, J., et al., 2008). Dle publikovaných výsledků fáze III randomizované klinické studie s lenvatinibem bylo dosaženo primárního end-pointu – u celkem

954 pacientů s pokročilým HCC byl porovnáván lenvatinib a sorafenib v 1. linii léčby, kdy nebyl zjištěn rozdíl v celkovém přežití – u lenvatinibu 13,6 měsíců vs. 12,3 měsíců u sorafenibu. Lenvatinib tak lze považovat za novou možnost léčby pokročilého HCC v 1. linii (Kudo, M., et al., 2018).

V případě selhání sorafenibu je možné pokračovat 2. linií systémové léčby. Donedávna byl v České republice jediným registrovaným lékem s prokázanou účinností v této indikaci regorafenib. V pilotní multicentrické randomizované mezinárodní studii bylo OS signifikantně zvýšené u pacientů léčených regorafenibem (10,6 měsíců) ve srovnání s placebem (7,8 měsíců, $p < 0.0001$) (Bruix, J., et al., 2017). Mezi hlavní nežádoucí účinky patří průjem, únava a arteriální hypertenze.

Dalším novým lékem s prokázanou účinností pro léčbu pokročilého HCC v 2. linii je cabozantinib. Tento lék má výrazné imunomodulační účinky, usnadňuje zvýšenou infiltraci nádoru efektorovými T lymfocyty přímou redukcí vaskularizace nádoru. Působí jako inhibitor VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor), neboli tzv. antiVEGF preparát (Kwilas, A. R., et al., 2014). V klinických studiích ve srovnání s placebem významně prodlužoval OS a také přežití bez progresu (progression free survival, PFS) (Abou-Alfa, G. K., et al., 2018).

Imunoterapie u HCC se ukazuje jako velmi dobrá možnost léčby. Vzhledem k úspěchům této cílené terapie u jiných typů nádorů (jako je např. maligní melanom) probíhá několik klinických studií s check-point inhibitory. Tzv. check-pointy či kontrolní body jsou zodpovědné za toleranci vůči vlastním tkáním, zasahují do interakcí imunitního systému a nádorových buněk. Klinicky využívané inhibitory blokuji cytotoxický T lymfocytární antigen-4 (CTLA-4), membránový protein programované buněčné smrti (PD-1) a ligand PD-1 receptoru (PD-L1) (Greenwald, R. J., et al., 2005). Recentní studie s nivolumabem, monoklonální protilátkou, která blokuje receptor PD-1 exprimovaný na aktivovaných T lymfocytech, ukázala dobrý bezpečnostní profil léku u pacientů s pokročilým HCC (El-Khoueiry, A. B., et al., 2017).

Jako velmi slibná se zdá kombinace bevacizumabu a atezolizumabu. Bevacizumab je inhibitor VEGF, v kombinaci s atezolizumabem, který se váže na PD-L1, tak dochází k synergistickému působení. Výsledkem je inhibice vyžívání imunosupresivních T lymfocytů a naopak zvýšená aktivita efektorových T lymfocytů, dochází ke snadnější infiltraci nádoru imunokompetentními buňkami, nádorové mikroprostředí se tak mění ve prospěch aktivní imunitní reakce (Ott, P. A., et al., 2015). První recentní publikované výsledky ukazují, že tato kombinace je vysoce účinná v porovnání se sorafenibem, bez závažných nežádoucích účinků, bylo prokázáno prodloužení OS a PFS (Galle P.R., F. R. S., Qin S., Masafumi M., et al., 2020).

V současné době probíhá řada klinických studií s multikinázovými inhibitory jako je např. brivanib, linifanib, erlotinib či sunitinib, v době sepisování této práce nebylo u žádných z výše uvedených léčiv dosaženo primárního end-pointu v klinických studiích, ať už se jednalo o superioritu/non-inferioritu se sorafenibem či efekt ve srovnání s placebem v 2. linii léčby (Cainap, C., et al., 2015; Cheng, A. L., et al., 2013; Johnson, P. J., et al., 2013; Zhu, A. X., et al., 2015).

Díky intenzivnímu výzkumu se od roku 2016 výrazně změnily léčebné možnosti pokročilého HCC, kdy byl sorafenib jedinou možností. V době sepisování této práce jsou v kontextu ČR k dispozici nově dva léky v první linii – sorafenib a lenvatinib, pro druhou linii terapie dva léky - regorafenib a cabozantinib. Nivolumab t. č. nemá schválenou indikaci pro léčbu pokročilého HCC v ČR, dle doporučení Evropské společnosti pro lékařskou onkologii jej lze využít v monoterapii do 2. linie léčby (Vogel, A., et al., 2018). Slibnou alternativou jsou klinické studie využívající kombinace inhibitorů VEGF s check-point inhibitory pro svůj synergistický protinádorový účinek.

Pacienti patřící do stadia B a C tedy tvoří celkem 50% všech nemocných s HCC (Llovet, J. M., Bruix, J., 2003). Aktuálně dostupné modalitty léčby pro tyto pacienty jsou pouze paliativní – pro pacienty obou skupin je 3 leté přežívání 10 - 40 % (Llovet, J. M., et al., 2008). U HCC stadia B a C dochází k největšímu rozvoji léčebných možností, intenzivně jsou studovány kombinace jednotlivých modalit. Opakovaně byla zkoušena možnost kombinace TACE jaterních ložisek s podáváním sorafenibu. Cílem kombinace těchto metod je „atakovat“ vaskularizaci ložiska embolizací a inhibicí angiogeneze, kdy dochází k synergickému působení sorafenibu a doxorubicinu (Erhardt, A., et al., 2014). Tento efekt nebyl na mnoha pracích opakovaně prokázán, až recentně publikovaná práce japonských autorů poprvé ukazuje nejenom prodloužení OS, ale také PFS u této kombinované léčby ve srovnání se samotnou TACE (Kudo, M., et al., 2018). Autoři považují za klíčový faktor vedoucí k dosažení primárního end-pointu této studie dlouhodobé užívání sorafenibu (Kudo, M., 2018).

1.1.6.5 Stadium D

Pacienti v terminálním stadiu HCC nejsou v současné době indikováni ke specifické léčbě, pouze k symptomatickému postupu. Celkem tato skupina zahrnuje až 20% nemocných s HCC, jejich očekávané přežití je méně než 3 měsíce (Llovet, J. M., et al., 2008).

1.2 Oxidační stres

Jak bude podrobněji uvedeno dále, v procesu jaterní kancerogeneze hraje klíčovou roli oxidačního stres za účasti reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS). Oxidační stres lze definovat jako poruchu rovnováhy mezi produkcí RONS a antioxidační kapacitou organismu. Mezi RONS se řadí volné radikály, což jsou vysoce reaktivní molekuly s nespárovaným valenčním elektronem; dále také sloučeniny, které snadno oxidují jiné látky nebo se na radikály mění. Přehled RONS uvádí Tabulka 1. Aerobní buňky jsou při produkci energie závislé na molekulárním kyslíku. Kyslík je druhý nejelektronegativnější prvek, má dva nepárové elektrony a tudíž se jedná o diradikál. Jeho postupnou redukcí vzniká superoxid, peroxid a hydroxylový radikál. Volné radikály vznikají v organismu za patologických ale i fyziologických podmínek. RONS v organismu vznikají tedy i fyziologicky, a samozřejmě za specifických patologických podmínek; faktory vzniku RONS dělíme na vnější a vnitřní.

K vnějším faktorům vzniku RONS v organismu patří např. ionizující záření (fotolýza vody za tvorby hydroxylového radikálu), UV záření a obecně expozice xenobiotikům.

Mezi tzv. vnitřní zdroje RONS patří například dýchací řetězec, kdy dochází k významné produkci superoxidu komplexem I a III. K tvorbě superoxidu a dalších RONS dochází také pomocí enzymu NADPH oxidázy (NOX) u oxidačního vzplanutí neutrofilů, kdy jsou tyto cytotoxické látky využity při fagocytóze.

NOX je multiproteinový komplex katalyzující produkci ROS přenosem elektronů z intracelulárního NADPH na kyslík za vzniku superoxidového aniontu, který je dalšími procesy převeden na peroxid vodíku a další ROS (Quinn, M. T., Gauss, K. A., 2004).



Rodina NOX zahrnuje sedm izoenzymů (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 a DUOX2), každý z nich se specifickou tkáňovou distribucí (Lambeth, J. D., 2002). NOX se skládá celkem z pěti komponent uložených částečně v cytosolu (p40^{PHOX} , p47^{PHOX} , p67^{PHOX}) a v membráně sekrečních váčků a specifických granul (p22^{PHOX} , $\text{gp91}^{\text{PHOX}} = \text{NOX2}$). Oddělení těchto dvou skupin do odlišných buněčných kompartmentů zajišťuje inaktivitu NOX v klidových buňkách (Babior, B. M., 2004). NOX2, prototyp NADPH oxidázy, je vysoce exprimována v neutrofilech, kde po aktivaci vede k oxidačnímu vzplanutí a tím k antimikrobiální aktivitě (Maghazal, G. J., et al., 2012). HCV aktivuje NOX2 v Kupfferových buňkách (de Mochel, N. S., et al., 2010). K aktivaci dochází díky interakci jednotlivých proteinů, NOX 2 vytváří komplex s proteinem p22, který jej stabilizuje a zajišťuje vazbu

k ostatním podjednotkám (Bedard, K., Krause, K. H., 2007). Protein p22 je exprimován v jaterních hvězdčovitých buňkách (Bachmann, S., Ramasubbu, K., 1997). Hlavní úlohou ROS vytvořených v hepatocytech pomocí NOX je apoptóza jaterní buňky (Lee, Y. S., et al., 2004).

V neposlední řadě je významný vznik hydroxylového radikálu při tzv. Fentonově reakci. Jedná se o reakci peroxidu vodíku s iontem přechodného kovu, v lidském organismu se jedná především o dvojmocné železo nebo jednomocnou měď.



Tabulka 1: Přehled reaktivních forem kyslíku a dusíku

Radikály	Non-radikály
ROS	
Superoxid ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	Peroxid vodíku (H_2O_2)
Hydroxylový radikál (HO^\bullet)	Kyselina chlorná (HClO)
Peroxyl (ROO^\bullet)	Singletový kyslík ($^1\text{O}_2$)
Alkoxyl (RO^\bullet)	Ozon (O_3)
Hydroperoxyl (HO_2^\bullet)	Nitrosyl (NO^+)
RNS	Nitroxid (NO)
Oxid dusnatý (NO^\bullet)	Peroxynitrit (ONOO)
Oxid dusičitý (NO_2^\bullet)	Alkylperoxynitrit (ROONO)
	Kyselina dusitá (HNO_2)

Upraveno podle (van Haften, R. I., et al., 2003).

Trvající produkce RONS vede k oxidačnímu poškození buněčných složek a poškození funkce buňky. Mezi nejzranitelnější cíle oxidačního poškození patří proteiny, lipidy a DNA (Halliwell, B., 1996).

U proteinů dochází k oxidaci thiolových skupin za vzniku disulfidických můstků, následnými reakcemi dochází ke změně terciální struktury proteinu. Konečným důsledkem jsou pak například ztráta enzymatické aktivity a alterace buněčných funkcí (Davies, K. J., 1987). Dále může docházet ke zkřížené reakce s protilátkami a iniciace autoimunitních onemocnění. V případě lipidů dochází často k řetězové peroxidaci lipidů, kdy dochází k amplifikaci

poškození nenasycených mastných kyselin. Mechanismem je ztráta fragilních dvojných vazeb a produkce reaktivních metabolitů (Ayala, A., et al., 2014). Konečným důsledkem je změna fyzikálně-chemických vlastností membrány a plasmatických lipoproteinů. V případě DNA dochází ke zlomu řetězce či ke změně báze, následně pak k translačním chybám, mutacím a iniciaci kancerogeneze (Dizdaroglu, M., et al., 2002).

Zvýšený oxidační stres se tak podílí na vzniku mnoha závažných chorob jako je například diabetes mellitus, hypertenze, ateroskleróza, neurodegenerativní onemocnění a v neposlední řadě nádorová onemocnění (Harrison, D., et al., 2003; Khansari, N., et al., 2009; Uttara, B., et al., 2009).

Regulace koncentrace RONS probíhá pomocí antioxidačních systémů. Patří mezi ně antioxidační substráty a antioxidační enzymy. K nejvýznamnějším antioxidačním substrátům patří bilirubin, albumin, kyselina močová, vitamíny A, C, E, karoteny, flavonoidy, či koenzym Q₁₀ (Hensley, K., et al., 2000), mezi nejvýznamnější enzymy patří:

- superoxiddismutáza (SOD) – dismutací dvou molekul superoxidu vzniká peroxid vodíku a kyslík, existují dva izoenzymy SOD – v cytoplasmě buněk (obsahující měď a zinek) a v mitochondriích (obsahující mangan) (Bannister, J. V., et al., 1987)
- kataláza (CAT) – peroxidáza obsahující hemové železo, redukuje dvou molekul peroxidu vodíku na vodu
- glutathionperoxidáza (GPX) – enzym obsahující selenocystein, katalyzuje redukci oxidovaných biomolekul, zejména peroxidů v membránách a plasmatických lipoproteinů, dochází k oxidaci dvou molekul glutathionu (GSH) za vzniku oxidované formy s disulfidickým můstkem (GSSG)
- glutathionreduktáza (GR) – redukuje GSSH za pomoci NADPH (Michiels, C., et al., 1994)
- hemoxygenáza (HMOX) a biliverdinreduktáza (BLVR) budou zmíněny v kapitole 1.4

1.3 Jaterní kancerogeneze

1.3.1 Patogeneze jaterní kancerogeneze

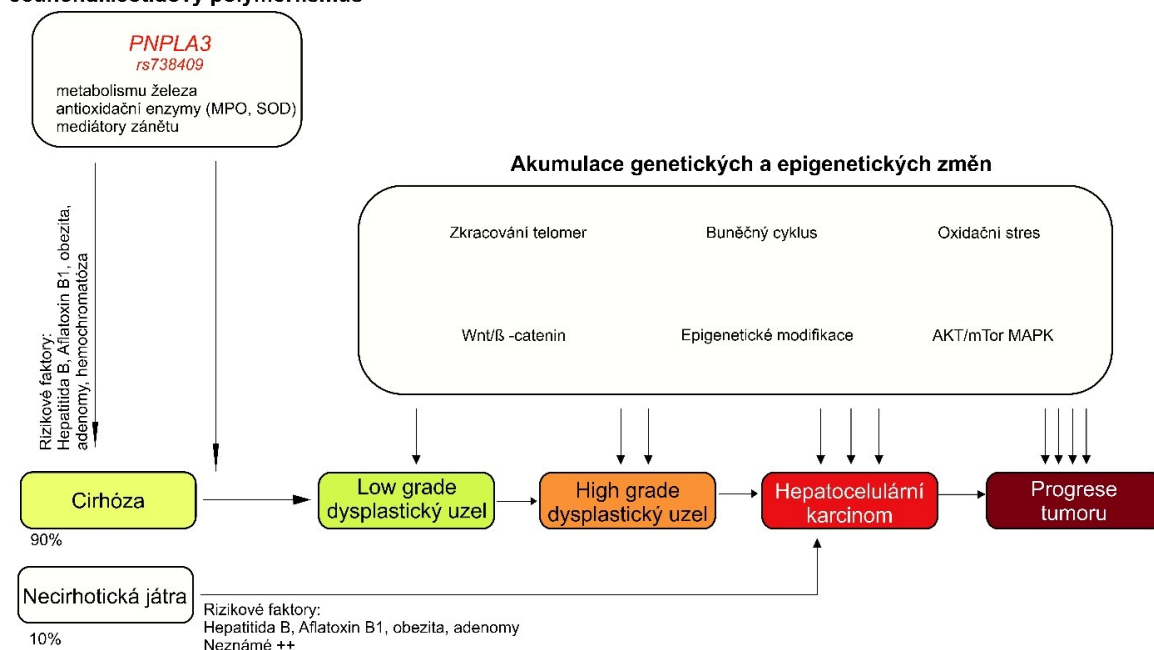
Vlastní jaterní kancerogeneze je komplexní proces zahrnující všechny proonkogenní a protektivní mechanismy. V teorii maligní transformace jde o tzv. koncept více kroků. Klíčovým mechanismem je vznik chronického jaterního onemocnění, jaterní cirhózy a dysplastických uzlů, dále mutace postihující alespoň jeden onkogenní nebo tumor

supresorový gen (Tornillo, L., et al., 2002). Společným jmenovatelem je přítomnost zvýšeného oxidačního stresu. Za spouštěcí moment kancerogeneze je považována zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS), iniciujících dále vznik chronického jaterního onemocnění. Játra jsou orgánem s největším obsahem mitochondrií, které jsou zdrojem ROS. Po aktivaci neutrofilů a Kupfferových buněk dochází k jejich invazi do jaterní tkáně a následnému poškození hepatocytů. Za patologických podmínek tedy preexistující chronické jaterní onemocnění dále zvyšuje oxidační stres.

Při neregulovaném a dlouhodobém vzniku ROS dochází k poškození hepatocytu včetně jeho DNA (Pal, S., et al., 2010). Patogeneze HCC je velmi komplikovaná, jednotlivé kroky kancerogeneze jsou různé u různých příčin onemocnění. Je již popsána celá řada mutací genů kódujících tumorsupresorové proteiny, transkripční faktory či regulační proteiny signálních drah, které jsou zapojeny do jaterní kancerogeneze (Edamoto, Y., et al., 2003). HCC je velmi komplexní heterogenní nádorové onemocnění, přesto sekvenování nové generace umožnilo již zmapovat četné genetické mutace vedoucí k HCC. Ukazuje se, že každý nádor je z genetického hlediska unikátní, počet alterovaných proteinů v jednotlivém tumoru se odhaduje na 50 až 70 (Guichard, C., et al., 2012). V játrech se tak mohou vyskytovat současně metastázy i ložiska *de novo* vznikající odlišným mechanismem kancerogeneze v terénu cirhózy (Ahn, S. M., et al., 2014). Většina těchto mutací se ale akumuluje náhodně, za nejdůležitější, klíčové mutace se považují mutace genů regulujících buněčný cyklus, telomerázu, oxidační stres, dále signální kaskády AKT / mTOR / MAPK a Wnt (podrobněji viz níže). Dále dochází k epigenetickým modifikacím, zejména methylaci DNA a regulace pomocí nekódujících RNA (miRNA, viz kapitola 1.3.2.2) (Rebouissou, S., Nault, J. C., 2020). Zjednodušeně jednotlivé genetické mutace vedoucí k HCC přibližuje Obrázek 5.

Obrázek 5: Genetické predispozice a vývoj mutací u HCC

Jednonukleotidový polymorfismus



Volně podle (Rebouissou, S., Nault, J. C., 2020)

Gen *TP53* (tumor protein 53)

Jeden z nejdůležitějších tumor supresorových genů, jeho produktem je protein p53, který byl popsán v roce 1979 (Lane, D. P., Crawford, L. V., 1979; Linzer, D. I., Levine, A. J., 1979). Lidský p53 se skládá z 393 aminokyselin, má 23 různých fosforylačních a defosforylačních míst. Tento protein patří mezi transkripční faktory, je senzorem poškození DNA tzv. „strážce genomu“, kdy aktivuje genovou expresi negativních regulátorů buněčného cyklu a aktivátorů apoptózy. Tím se účastní řízení buněčných procesů, jako jsou zástava buněčného cyklu v G1 a S fázi, inhibice replikace DNA a tím udržování stability genomu (Agarwal, M. L., et al., 1998; Shao, C., et al., 2000). Až u 50% všech nádorových onemocnění je popsána mutace genu *p53* (Hollstein, M., et al., 1994). Genetická analýza prokázala, že bodová mutace G → T v kodonu 249 je klíčovou mutací pro rozvoj HCC u expozice aflatoxinem (Hsu, I. C., et al., 1991). Spolu s chronickou HBV infekcí tato mutace působí synergisticky pro rozvoj HCC (Chen, C. J., et al., 1996).

Telomeráza

Jedná se o ribonukleoproteinový komplex, skládající se z telomerázové reverzní transkriptázy (TERT) a RNA podjednotky, sloužící jako templát pro syntézu telomer (repetitivní úseky DNA v koncových částech chromozomů) (Greider, C. W., Blackburn, E. H., 1987). V terénu chronické jaterní léze za přítomnosti zánětu dochází k nekrózám hepatocytů, následované jejich proliferací. Tento opakovaný proces vede k vyčerpání regenerační kapacity hepatocytů, v dospělých játrech tak díky absenci telomerázové aktivity dochází ke zkracování telomer a v konečném důsledku ke vzniku cirhotické přestavby (Farazi, P. A., DePinho, R. A., 2006). Naopak až u 95 % všech HCC se objevuje re-exprese TERT, jedná se tak o první krok jaterní karcinogeneze; jako jediná z hlavních mutací byla popsána u low grade i high grade dysplastických uzlů (5 – 20 % mutací) tak i u časného HCC (60 % mutací) (Nault, J. C., et al., 2014; Torrecilla, S., et al., 2017). Nabízí se tak otázka využití stanovení mutace TERT jako biomarkeru predikce maligní transformace dysplastických uzlů.

PI3K / AKT / mTOR signalizační kaskáda

Tato dráha je zodpovědná za stimulaci buněčného růstu, proliferaci, diferenciaci, dále blokuje apoptózu. Je velmi komplexní, s možností vícestupňové inhibice. mTOR (mammalian target of rapamycin) je serin/threoninová kináza a je členem rodiny fosfatidylinositol-3-kináz (PI3K), má dvě podjednotky mTOR1 a mTOR2. Obě tyto podjednotky jsou uzlovým bodem vícero signálních drah, integrací buněčných signálů dochází k aktivaci anabolických drah - syntéze lipidů, proteinů a nukleových kyselin, dále k organizaci tvorby cytoskeletu a autofagie (Li, J., et al., 2014). Mutace této dráhy se vyskytuje až u 70 % případů rakoviny prsu (Lee, J. J., et al., 2015), dále je významně zastoupena v patogenezi kolorektálního karcinomu a karcinomu prostaty. U HCC se modifikace této dráhy uplatňuje především u NASH a je spojena s inzulinovou rezistencí (Kudo, Y., et al., 2011). Inhibice mTOR je terapeutickým cílem řady nádorových onemocnění.

MAP kinázová kaskáda

Tyto signalizační kaskády jsou vysoce konzervativní u všech eukaryotických buněk (Zhang, T., et al., 2006). Shodným mechanismem aktivace je fosforylace, kaskáda zahrnuje nejméně tři proteinové kinázy v sérii. Koncové kinázy jsou translokovány do jádra buňky a fosforylují transkripční faktory. Dochází tak k ovlivnění genové exprese mnoha genů. Způsobují například stimulaci buněčného růstu a blokaci programované buněčné smrti. Indukcí

transkripčních jaderných protoonkogenů *c-Fos* a *c-Jun* v terénu NASH a inzulinové rezistence dochází k fibrogenezi a ke vzniku HCC (Chettouh, H., et al., 2015).

RB protein (také RB1)

Jedná se o tumorsupresorový protein složený z 928 aminokyselin, jehož hlavní funkcí je regulace restrikčního bodu v G1 fázi buněčného dělení (Sherr, C. J., Roberts, J. M., 1999). V G1 fázi RB1 protein váže transkripční faktory E2F, čímž zabraňuje transkripci mnoha cílových genů. Cyklin-dependentní kinázy (CDK) fosforylují RB protein a tím dochází k uvolnění transkripčních faktorů, následně k syntéze mRNA cyklinu D a cyklinu E. Tím dochází k regulaci průchodu buňky z G1 fáze do S fáze. Mutace *RB1* genu vede ke vzniku retinoblastomu (Friend, S. H., et al., 1986). Porucha jeho regulace byla popsána u HCC vznikajícího v terénu HBV, HCV či alkoholové choroby jater (Edamoto, Y., et al., 2003).

Wnt signalizační kaskáda

Signalizační dráha, jejíž aktivací dochází ke kumulaci β -cateninů v cytoplasmě. β -catenin má funkci jednak strukturální – podílí se na mezibuněčných adhezích vazbou na cytoplazmatickou část cadherinů, což jsou transmembránové proteiny, které propojují sousední buňky. Další jeho funkcí je signalizace, kdy pomocí aktivace transkripce cílových genů dochází k regulaci buněčné proliferace za fyziologických podmínek především v embryonálním vývoji (Brantjes, H., et al., 2002; Morin, P. J., 1999). Porucha této signalizace se nachází u kolorektálního karcinomu, kdy je inaktivován protein APC (adenomatous polyposis coli), podporující fosforylaci a degradaci β -cateninů. Dědičné mutace genu APC jsou příčinou vzniku familiární adenomatózní polypózy. V kancerogenezi HCC se významně uplatňuje především díky nežádoucí signalizaci mezi několika dalšími regulačními drahami (Liu, L. J., et al., 2016).

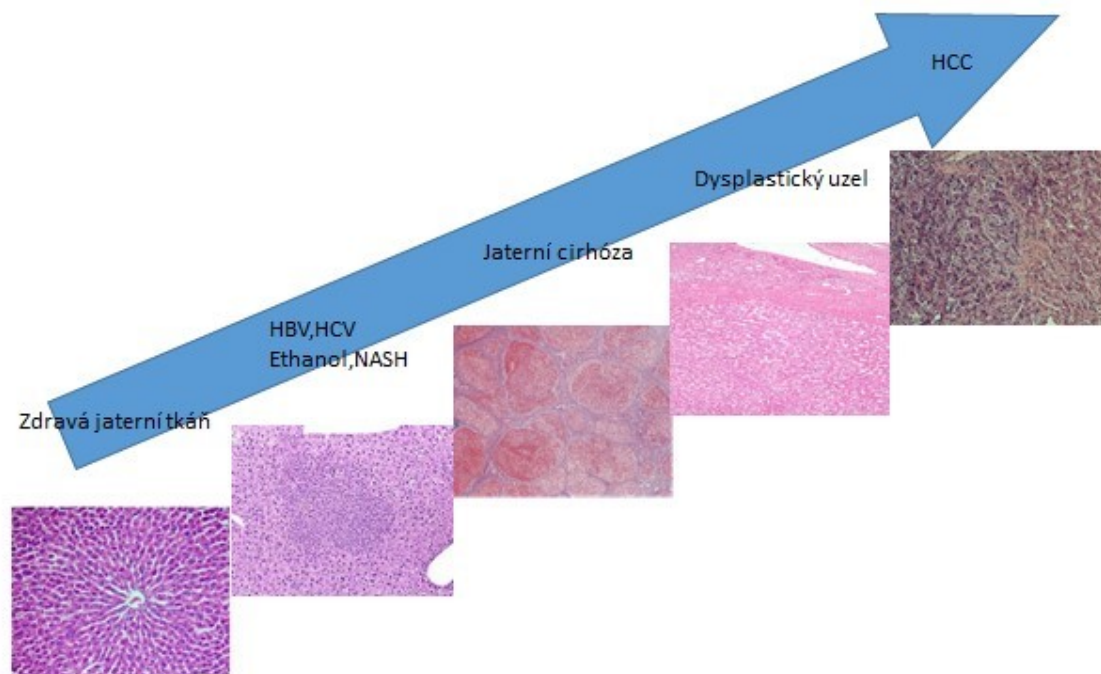
MET onkogen

S rozvojem imunoterapie intenzivně zkoumaný gen kódující tyrozinkinázový receptor MET (mesenchymal epithelial transition), jehož ligandem je růstový faktor pro hepatocyty (hepatocyte growth factor, HGF). Overexprese nebo amplifikace tohoto genu vede k proliferaci nádorových buněk, neoangiogenezi, invazivitě a šíření nádoru (Gherardi, E., et al., 2012). K tomu dochází až u 20 - 48 % HCC, jedná se o prognosticky nepříznivý ukazatel spojený s horším přežíváním pacientů (Osada, S., et al., 2008).

V rozsáhlých genomových studiích byly popsány jednonukleotidové polymorfismy (SNP) asociované s rozvojem HCC, jednalo se například o geny některých enzymů asociovaných s oxidačním stresem (myeloperoxidáza, MPO) či mediátorů zánětu (Nahon, P., Zucman-Rossi, J., 2012). Za významnější lze považovat SNP asociované s rozvojem jaterního onemocnění vedoucí k HCC, jako je např. PNPLA3 u NASH (bude diskutováno dále). V současnosti není dostatek dat, která by podpořilo implementaci stanovení jednotlivých SNP v klinické praxi, naopak kombinace několika SNP spolu s klinickými údaji pacientů by mohla vést ke stratifikaci rizika vzniku HCC.

V klasickém konceptu vícestupňové jaterní kancerogeneze je předpokládána jasná sekvence změn, tj. chronické jaterní onemocnění - fibróza - cirhóza - dysplastické uzly a z nich vznik HCC. Zásadním poznatkem byla publikace autorů Arakawa a kol., z roku 1986, kdy autoři na několika případech popsali maligní zvrát dysplastických uzlů v terénu jaterní cirhózy a vyslovili teorii, že dysplastické uzly jsou preneoplastickou lézí HCC (Arakawa, M., et al., 1986).

Obrázek 6: Vícestupňový koncept maligní transformace



Upraveno podle (Tornillo, L., et al., 2002).

Jaterní cirhóza byla považována za nezbytný mezistupeň. Jednotlivé etiologické faktory ale výrazně ovlivňují celý proces kancerogeneze, kdy například HBV indukovaný HCC může vzniknout v játrech bez jaterní cirhózy, podobně jako je to často pozorováno u pacientů s NASH. Naopak vznik HCV indukovaného HCC je typický v cirhotických játrech.

V klinické praxi často vidíme kombinaci jednotlivých škodlivých inzultů či etiologických agens (např. abusus alkoholu a stav po HBV infekci), kdy dochází k potenciaci zánětlivých a proonkogenních procesů. Velmi zjednodušeně se dá říct, že procesy vedoucí ke vzniku HCC do sebe mohou volně přecházet, ale i se navzájem kombinovat a potencovat. Iniciátor chronické zánětlivé odpovědi může být jiný než spouštěč genetické mutace. Iniclace oxidačního stresu může probíhat například působením viru HCV, kdy poté chronické zánětlivé změny vedou ke genetickým mutacím; v případě infekce virem HBV dochází naopak jeho přímým působením k narušení stability genomu díky začlenění virové DNA do genomu hepatocytu. Kombinací genetických mutací regulačních a řídících genů zmíněných výše a patologických imunitních reakcí v terénu chronického jaterního onemocnění dochází ke vzniku HCC (Takaki, A., Yamamoto, K., 2015). Recentní genetické studie ukazují výraznou genomovou diverzitu HCC. Tato skutečnost by vysvětlovala v klinické praxi často pozorovanou velmi rozdílnou úspěšnost v léčbě i v rámci jednotlivých stádií HCC dle BCLC klasifikace. Nejnovější práce ukazují možné využití vyšetření jednotlivých mutací jako biomarkeru ke sledování úspěšnosti léčby, kdy například autoři Ahn a kolektiv prokázali asociaci mutace RB1 s délkou doby přežití bez nemoci (disease free survival, DFS) po resekci HCC (Ahn, S. M., et al., 2014). V případě využití toho biomarkeru v klinické praxi by se jednalo o zvlášť důležitý faktor v pooperačním sledování pacientů s HCC, protože ač je resekce ve stadiu A kurativní metodou léčby pro HCC, rekurence v 5 letém intervalu po resekci dosahuje 50% případů (Tabrizian, P., et al., 2015). V tomto případě by tedy šlo identifikovat pacienty indikované k další terapeutické intervenci.

Další důležitou oblastí výzkumu jsou markery angiogeneze. Je známým faktem, že HCC je hypervaskularizovaný nádor s bohatým krevním zásobením, proto by mediátory angiogeneze mohly mít využití jako diagnostické i prognostické ukazatele v managementu HCC (Kuroi, K., Toi, M., 2001). Vaskulární endoteliální růstový faktor A (VEGFA) je nejsilnější přímo působící mediátor angiogeneze za fyziologických i patofyziologických podmínek (Carmeliet, P., Jain, R. K., 2000). Sérové hladiny VEGFA odrážejí stupeň jaterního poškození, u pacientů s HCC v terénu HCV podmíněné jaterní cirhózy jsou signifikantně zvýšené (Mukozu, T., et al., 2013).

Genetické profilování by mohlo být dalším parametrem určujícím staging a grading onemocnění a tím potažmo doporučit nejvhodnější léčebnou strategii či jejich kombinaci. V rámci BCLC klasifikace by mohlo výhledově doplnit charakteristiky tumoru – tj. velikost, počet ložisek a extrahepatální šíření. Optimálně by tedy určení jednotlivých subtypů HCC mohlo vést k úplné individualizaci léčby HCC – například při průkazu mutace v signální dráze by daná signální dráha byla cílem potenciální terapie (Boyault, S., et al., 2007).

1.3.2 Mechanismy kancerogeneze u nejčastějších etiologických příčin

1.3.2.1 Imunitní reakce v kancerogenezi

Kupfferovy buňky jsou tkáňové makrofágy lokalizované ve stěně jaterních sinusoidů a představují největší populaci buněk nespecifické (přirozené) imunity v játrech (Parker, G. A., Picut, C. A., 2005). Spolu s endoteliálními buňkami sinusoid tvoří první bariéru pro patogeny vstupující do jater portální žílou (Vollmar, B., Menger, M. D., 2009). Při nákaze virem HBV či HCV dochází k interakci Kupfferových buněk s virovými partikulemi, kdy dojde k vazbě viru, jeho imunitnímu rozpoznání a produkci mediátorů zánětu (Cooper, A., et al., 2005; Tu, Z., et al., 2010). Následně dochází k inhibici virové replikace v hepatocytu, aktivaci sousedních buněk a atrakci a aktivaci dalších buněk imunitního systému, které dále potencují protivirovou a protizánětlivou reakci (Bilzer, M., et al., 2006). Tyto funkce Kupfferových buněk přispívají k obraně proti HBV a HCV v časně fázi infekce, ale mohou také přispívat k rozvoji tkáňového poškození při chronické virové infekci, kdy při perzistenci viru HBV a HCV v játrech dále dochází k rozvoji fibrózy. Při virové infekci dochází k indukci fibrogenese aktivací hvězdovitých buněk, ať už přímo či nepřímo, a to díky přítomnosti buněčného poškození, nekrózy a apoptózy buněk. Kupfferovy buňky dále produkují celou řadu profibrogenních faktorů jako je interleukin 6, TNF- α (tumor necrosis factor- α), TGF- α , TGF- β (transforming growth factor- α , β) a také ROS. Mimo to produkují enzymy zodpovědné za degradaci matrix, jako jsou kolagenázy a metaloproteinázy (Xidakis, C., et al., 2005), čímž významně přispívají do komplexního procesu fibrogenese. Zanikající hepatocyty v poškozené tkáni potencují další zánětlivou reakci a dochází ke kompenzatorní proliferaci přeživších hepatocytů (Maeda, S., et al., 2005). Pokračující cykly buněčné smrti a regenerace buněk zvyšují pravděpodobnost spontánních mutací DNA, které mohou vést ke vzniku HCC (Arzumanyan, A., et al., 2013). Matrix obklopující novotvořené nádorové buňky se mění a podporuje další růst nádoru (Chen, F., et al., 2015). Toto modifikované stroma se nazývá

nádorové mikroprostředí (Yang, J. D., et al., 2011), jehož součástí jsou buněčné komponenty jako hvězdčité buňky, fibroblasty, adipocyty, endotelie a imunoefektorové buňky (např. tumor-asociované makrofágy) (Quail, D. F., Joyce, J. A., 2013). Dále zahrnuje růstové faktory, cytokiny a složky extracelulární matrix (Tahmasebi Birgani, M., Carloni, V., 2017).

Takto formované nádorové mikroprostředí se komplexně podílí na růstu, invazi a metastazování nádoru. Je například schopno indukovat nadměrnou expresi inhibičních molekul ovlivňujících proliferaci cytotoxických T lymfocytů, což je jeden z mechanismů vzniku odolnosti nádorových buněk vůči imunitnímu systému (Ribas, A., 2015). Příkladem je zablokování receptoru programované smrti, čemuž lze zabránit podáním monoklonální protilátky nivolumab (viz výše). Buněčné složky nádorového mikroprostředí jsou geneticky stabilní a lze je také využít jako potenciální cíle onkologické léčby. V imunoterapii nádoru tak lze využít kombinace monoklonálních protilátek proti jednotlivým antigenům spolu s klasickou cytostatickou léčbou.

1.3.2.2 Kancerogeneze indukovaná infekcí virem hepatitidy B

Virus hepatitidy B je obalený hepatotropní virus obsahující cirkulární, částečně dvouvláknovou DNA, který spouští jaterní kancerogenezi několika mechanismy. Dochází k expresi proteinu HBx, což je multifunkční protein interagující s jadernými transkripčními faktory, zapojuje se též do regulace apoptózy. Dále dochází k integraci virové DNA do genomu buňky, což je považováno za časný stupeň kancerogeneze a v konečném důsledku vede k celkové nestabilitě genomu. Virová DNA perzistuje v jádře jaterní buňky ve stabilní formě v podobě minichromosomů, tzv. cccDNA (covalently closed circular DNA) (Summers, J., et al., 1990). V nádorové tkáni je integrovaná virová DNA zachycena v 86,4%, v přilehlé tkáni jen ve 30,7% případů (Sung, W. K., et al., 2012). Jednotlivé produkty viru jako např. DNA polymeráza, core protein, obalové proteiny (L, M a N) a již zmíněný multifunkční protein HBx přímo regulují onkogeny a zasahují do apoptózy. Přítomnost chromozomálních aberací je signifikantně zvýšena u HBV asociovaného HCC ve srovnání s HCC v terénu jiných jaterních onemocnění.

HBV tedy pravděpodobně zvyšuje genovou nestabilitu, také mutace a delece genu p53 jsou zde častější (Cougot, D., et al., 2005). Do procesu kancerogeneze dále zasahují imunitní reakce a zánětlivá odpověď v jaterní tkáni jak bylo zmíněno výše. Vlastní indukce oxidačního stresu u HBV asociovaných HCC má pravděpodobně minoritní úlohu v porovnání s HCC v terénu HCV infekce (Nishimura, M., et al., 2013), uplatňuje se především in vitro.

V mechanismu kancerogeneze u virové hepatitidy B se uplatňují microRNA (miRNA). Jedná se o evolučně konzervativní jednovláknové řetězce nekódující RNA o průměrné délce 22 nukleotidů (Ambros, V., 2004). Jejich funkcí je regulace genové exprese. Molekuly miRNA jsou komplementární k části jedné nebo několika konkrétním mRNA. Dysregulace několika miRNA byla popsána u HCC v terénu chronické HBV infekce, jejichž funkcí je buněčná invaze a migrace (Kong, G., et al., 2011; Yuan, K., et al., 2012). Například miR-122 je zvýšená u pacientů s časným HCC a byla zkoumána jako biomarker umožňující odlišení časného HCC od dysplastických uzlů (Hung, C. H., et al., 2016).

Zvláštní situací u HBV infekce je tzv. okultní infekce (occult hepatitis B infection, OBI), což je stav definovaný jako přítomnost HBV DNA v játrech testovaného jedince za současné negativity HBsAg v séru, PCR HBV DNA v séru může být negativní či do cut-off 200 IU/ml (Raimondo, G., et al., 2008). OBI si zachovává přímé mechanismy kancerogenního působení jako je schopnost integrace do hostitelského genomu (Pollicino, T., et al., 2004).

1.3.2.3 Kancerogeneze indukovaná infekcí virem hepatitidy C

Virus hepatitidy C je jednovláknový RNA virus kódující polyprotein, následně štěpený hostitelskými a virovými proteázami na čtyři strukturální (kapsidový protein C, glykoproteiny E1 a E2, protein P7) a šest nestructurálních proteinů (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A a NS5B) (Chevaliez, S., Pawlotsky, J. M., 2006). Jak už bylo uvedeno výše, infekce virem HCV je jedna z příčin vzniku závažného jaterního onemocnění včetně jaterní cirhózy a HCC. Infekce přechází do chronicity u 80% infikovaných jedinců ve srovnání s infekcí virem HBV, kde je to kolem 10% infikovaných pacientů. Jaterní cirhóza u HCV vzniká 20x častěji než u infekce virem HBV (Rehermann, B., Nascimbeni, M., 2005). HCV infekce je doprovázená výrazným zvýšením markerů oxidačního stresu, probíhající peroxidací lipidů a poškozením DNA (Marcellin, P., et al., 2002). Tyto procesy mohou být vysvětleny chronickým zánětem, pokračující produkcí RONS v játrech NADPH oxidázami, zvláště NOX-2 v polymorfonukleárech a v Kupfferových buňkách (Protzer, U., et al., 2012).

Kaskádu oxidačního stresu v infikovaných játrech spouští strukturální i nestructurální proteiny HCV (Lemon, S. M., McGivern, D. R., 2012). Dále dochází k indukci cytokinů a trvající zánětlivá reakce hepatocytů akceleruje apoptozu a následnou regeneraci hepatocytů, kdy dochází k snadnějšímu vzniku spontánních mutací DNA. Přímé mutagenní působení virových proteinů a RNA není tak jasně popsáno (na rozdíl od viru HBV), ale například core

protein se zapojuje do signalizačních drah buněčné proliferace a apoptózy (Lemon, S. M., McGivern, D. R., 2012; Yoshida, T., et al., 2002), dále také zvyšuje angiogenezi spouštěním produkce VEGF proteinu (Hassan, M., et al., 2009). U pacientů s chronickou HCV infekcí byla opakovaně dokumentována zvýšená akumulace železa v jaterní tkáni (Hino, K., et al., 2013). Ukládání železa probíhá ale také do buněk retikuloendoteliálního systému (Farinati, F., et al., 1995). V nadbytku přítomné dvojmocné atomy železa prostřednictvím Fentonovy reakce produkují reaktivní hydroxylové radikály. Dále dochází ke snížení transkripce hepcidinu následované zvýšenou expresí ferroportinu v enterocytech způsobující zvýšený re-uptake železa ve střevě (Miura, K., et al., 2008). Je popsáno několik miRNA zasahujících do replikace viru (Zhang, C., et al., 2012), v buňkách infikovaných HCV je snížena exprese určitých typů miRNA regulujících růst hepatocytů a metabolismus lipidů. Naopak je popsána zvýšená exprese jiných typů miRNA podporujících fibrogenezi (Shrivastava, S., et al., 2015).

1.3.2.4 Kancerogeneze indukovaná alkoholem

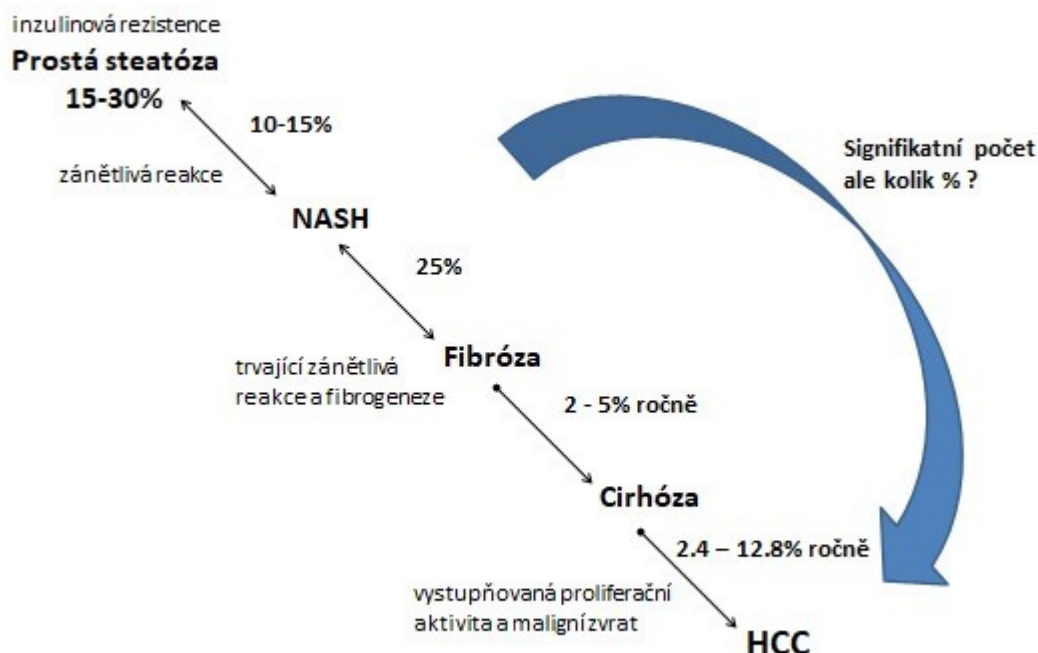
Dlouhodobý příjem alkoholu v dávce 50 - 70 g/den je dobře známým rizikovým faktorem rozvoje HCC (El-Serag, H. B., Rudolph, K. L., 2007). Dlouhodobá konzumace alkoholu vede k mnohočetným biochemickým změnám, které mohou iniciovat či potencovat kancerogenezi v játrech (Bellentani, S., et al., 1999). Mechanismů kancerogeneze u alkoholového poškození jater je několik, patří mezi ně toxický účinek metabolitů alkoholu, indukce ROS, zvýšená akumulace železa, dále také ovlivnění imunitních reakcí a pravděpodobně i potenciace neoangiogeneze (Sidharthan, S., Kottlilil, S., 2014). Acetaldehyd, jako hlavní metabolit alkoholu, má kancerogenní a mutagenní účinky (Tuma, D. J., Casey, C. A., 2003), váže se na proteiny, modifikuje DNA tvorbou aduktů (Brooks, P. J., 1997). Acetaldehyd zvyšuje produkci ROS v mitochondriích, čímž indukuje apoptózu hepatocytu (Wang, K., 2014); zvýšením koncentrace ROS dochází k aktivaci hvězdovitých buněk a iniciaci fibrózy (Kwon, H. J., et al., 2014). Samotný acetaldehyd poškozuje mitochondrie, čímž způsobuje snížení β -oxidace mastných kyselin (Lieber, C. S., 1994). Polymorfismus či mutace genů, které jsou zodpovědné za enzymy metabolizující acetaldehyd, mohou modifikovat jeho roli v jaterní kancerogenezi (Wilfred de Alwis, N. M., Day, C. P., 2007). V terénu alkoholové choroby jater dále dochází ke snížení cytotoxické aktivity NK buněk (Laso, F. J., et al., 1997). I v případě vzniku HCC v terénu alkoholové jaterní cirhózy již byla popsána úloha miRNA (miR-217, miR-155 a miR-212), jejichž modifikace oxidačním stresem vede k abnormální genové expresi (Chan, I. S., et al., 2014).

U pacientů s chronickým abusem alkoholu je také zvýšená absorpce železa ze střeva, přetížení jater železem je dalším rizikovým faktorem vzniku HCC v důsledku zvýšené tvorby ROS (Kew, M. C., 2014) ať už Fentonovou reakcí či v důsledku zvýšené peroxidace lipidů (Petersen, D. R., 2005). Do komplexního mechanismu kancerogeneze dále přispívá i kvantitativní a kvalitativní změna střevního mikrobiomu způsobená dlouhodobým požíváním alkoholu. U těžkých abuzérů se zvyšuje střevní permeabilita pro bakteriální lipopolysacharidy (LPS) (Bjarnason, I., et al., 1984), jejichž zvýšená hladina v portálním řečišti dále zvyšuje zánětlivou reakci v jaterní tkáni (Ramadori, P., et al., 2017). LPS se váží na komplex CD14 a TLR4 (toll-like receptor) Kupfferových buněk, dochází k produkci prozánětlivých cytokinů jako jsou například TNF- α , TGF- β a interleukin 6 (IL6) (Seki, E., Brenner, D. A., 2008).

1.3.2.5 Kancerogeneze indukovaná NAFLD/NASH

Nealkoholové ztukovatění jater či nově nealkoholová jaterní choroba (NAFLD) je onemocnění charakterizováno nadměrnou akumulací tuku v játrech spojené s inzulinovou rezistencí, dle histologického vyšetření je přítomna steatóza > 5 % hepatocytů (EASL-EASD-EASO, 2016). Pro diagnózu NAFLD je nutné vyloučení sekundární příčiny a vyššího příjmu alkoholu - denní konzumace alkoholu nepřesahuje 30 g čistého alkoholu pro muže, 20 g pro ženy (Ratziu, V., et al., 2010). Tato skupina či spektrum onemocnění zahrnuje jak prostou steatózu (non-alcoholic fatty liver, NAFL), kdy nedochází k buněčnému poškození a není přítomná fibróza, tak i NASH charakterizovanou přítomností zánětlivých změn, poškozením hepatocytu (ballooning) a různým stupněm fibrózy až po NASH cirhózu (Ludwig, J., et al., 1980). V širším kontextu chápeme NAFLD jako orgánovou manifestaci metabolického syndromu. U pacientů s NASH je typický vznik HCC i v necirhotickém terénu. Objevuje se množství prací, dokumentující signifikantní podíl pacientů s HCC v necirhotickém terénu, kumulativní roční incidenci ale neznáme, stratifikace rizika pro tyto pacienty je velmi obtížná (Cholankeril, G., et al., 2017). Přirozený průběh progresu do cirhózy či do HCC přibližuje následující Obrázek 7.

Obrázek 7: Přirozený průběh NAFLD / NASH



Upraveno podle (Schuppan, D., Schattenberg, J. M., 2013; White, D. L., et al., 2012)

Mechanismus kancerogeneze u NAFLD/NASH je multifaktoriální – jedná se pravděpodobně o kombinaci inzulínové rezistence, dlouhodobého chronického zánětu a dysregulaci střevního mikrobiomu vedoucí k expozici jaterní tkáně bakteriálnímu LPS (Margini, C., Dufour, J. F., 2016), to vše může být modifikováno přítomností určitých genových polymorfismů. Inzulínová rezistence a hyperinzulinémie zvyšuje expresi inzulínu a IGF1 (insulin-like growth factor-1), které dále vazbou na jejich receptory spouštějí signální kaskády PI3K a MAPK, čímž dochází k indukci buněčné proliferace a inhibici apoptózy (Janku, F., et al., 2014; Yang, S., Liu, G., 2017). Dalším důsledkem inzulínové rezistence je akumulace lipidů v játrech vedoucí k nadprodukci volných mastných kyselin a v konečném důsledku poté ke vzniku ROS během β oxidace v mitochondriích (Hirsova, P., et al., 2016), ROS a produkty peroxidace lipidů poškozují DNA a vedou k buněčným mutacím.

Aktivace TLR4 bakteriálními LPS pravděpodobně nespouští vlastní kancerogenezi, ale má vliv na proliferaci HCC a brání apoptóze (Dapito, D. H., et al., 2012). Recentní výzkum ukázal, že polymorfismus genu PNPLA3 (patatin-like phospholipase domain containing 3) kódujícího adiponutrin je hlavním genetickým faktorem korelujícím s progresí NASH (Romeo,

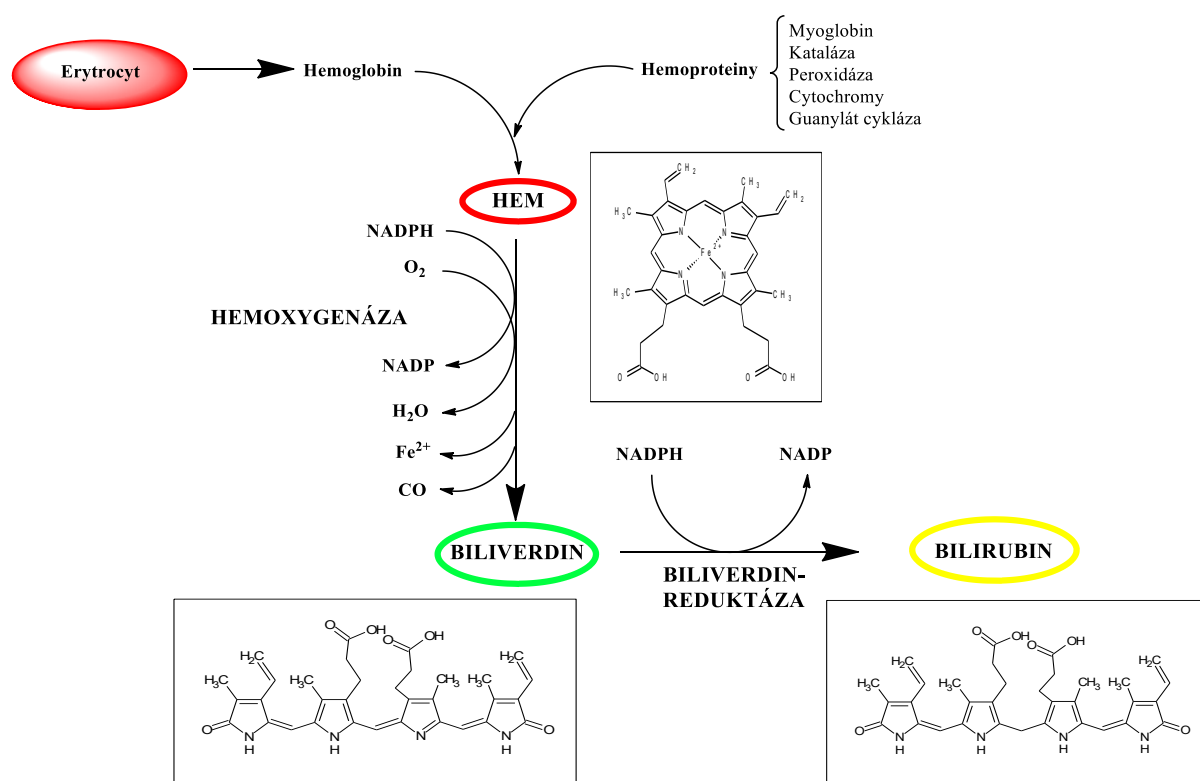
S., et al., 2008). Adiponutrin je enzym primárně exprimovaný v tukové tkáni a v játrech (Lake, A. C., et al., 2005), má funkci lipogenní i lipolytickou. Několik studií dále prokázalo asociaci mezi přítomností PNPLA3 rs738409 G alelou (respektive u GG homozygotů) a rozvojem HCC (Burza, M. A., et al., 2012; Valenti, L., et al., 2013) a to nejen v terénu NAFLD/NASH, ale také u alkoholového jaterního onemocnění (Trepo, E., et al., 2014). Přítomnost homozygotní alely znamená 5 násobné riziko vzniku HCC, nezávisle na přítomnosti cirhózy (Liu, Y. L., et al., 2014). Zda tento genový polymorfismus ovlivňuje i chování HCC bez ohledu na základní jaterní onemocnění zatím není jasně prokázáno (Takeuchi, Y., et al., 2013) , i když některé práce dokumentují horší prognózu a snížení celkového přežívání v terénu NAFLD/NASH a alkoholového jaterního onemocnění (Valenti, L., et al., 2013).

1.4 Katabolická dráha hemu

Hem je cyklický tetrapyrrol s centrálně vázaným atomem železa, který je součástí hemoproteinů, je exprimován ve většině tkání (Vitek, L., Ostrow, J. D., 2009). Mezi funkce hemoproteinů patří transport kyslíku (hemoglobin, myoglobin), metabolismus xenobiotik (cytochrom P-450), buněčná signalizace (guanylátcykláza), účastní se transportu elektronů v dýchacím řetězci a jsou součástí antioxidačních systémů (Dutra, F. F., Bozza, M. T., 2014).

Katabolická dráha hemu je současně syntetickou dráhou bilirubinu. Přibližně 80 % denní produkce bilirubinu pochází z rozpadu erytrocytů v monocyto-makrofágovém systému sleziny, jater a kostní dřeně. Celkový denní obrat hemoglobinu je cca 6 - 8 g, denní produkce hemu činí tedy až 300 mg, což odpovídá 250 – 300 mg bilirubinu. V prvním kroku dochází za spotřeby NADPH a dvou atomů kyslíku k rozštěpení cyklického tetrapyrrolového kruhu na biliverdin enzymem hemoxygenázou (HMOX). Uvolňuje se oxid uhelnatý a železnatý kationt. Následně dochází za pomoci biliverdinreduktázy (BLVRA) k redukci centrálního methinového můstku biliverdinu na methylenový, čímž vzniká za další spotřeby NADPH bilirubin.

Obrázek 8: Katabolická dráha hemu



Upraveno podle (Dolphin, D., 1978; Schulz, S., et al., 2012).

HMOX má dvě izoformy - HMOX 1 (inducibilní izoenzym) a HMOX 2 (konstitutivní izoenzym), dále také někdy popisovaná HMOX 3, který vykazuje 90% homologie s HMOX 2. Gen lidské HMOX1 se nachází na chromozomu 22q12. HMOX katalyzuje přeměnu hemu na biliverdin, oxid uhelnatý a železo. Izoforma HMOX1 je indukována faktory vyvolávající oxidační stres, aktivace exprese HMOX1 je považována za adaptační odpověď buňky na tyto podněty (Motterlini, R., et al., 2002). Zvýšená enzymatická aktivita má také cytoprotektivní, neurotransmitterové a protizánětlivé účinky (Willis, D., et al., 1995). Přestože tedy zvýšení exprese *HMOX* přináší určitá pozitiva pro buňku, role v kancerogenezi zůstává dosud kontroverzní (Was, H., et al., 2010).

Mezi další enzymy katabolické dráhy hemu patří biliverdinreduktáza (BLVR), redukující biliverdin na bilirubin. Tento ubikviterní, převážně cytozolický enzym hraje velmi významnou roli v buněčné ochraně před zvýšeným oxidačním stresem (Vitek, L., Schwertner, H. A., 2007). Jsou popsány dvě izoformy tohoto enzymu – BLVRA, hlavní izoenzym BLVR u dospělých; BLVRB, predominantní enzym degradace biliverdinu u plodu (Cunningham, O.,

et al., 2000). BLVRA působí též jako transkripční faktor (O'Brien, L., et al., 2015), unikátní serin/threonin/tyrosin kináza (Lerner-Marmarosh, N., et al., 2005), membránový receptor účastnící se imunitních reakcí (Wegiel, B., et al., 2009). Jeho role v karcinogenezi stále není plně objasněna (Gibbs, P. E., et al., 2015).

2 HYPOTÉZY A CÍLE STUDIE

Tato práce navazuje na naši předchozí studii analyzující expresi enzymů katabolické dráhy hemu u pacientů s HCV infekcí. Byla prokázána významně zvýšená exprese *BLVRA* v krvi a v jaterní tkáni infikovaných pacientů v porovnání se zdravými kontrolami. Bazální exprese *BLVRA* byla asociována s odpovědí na protivirovou terapii (Subhanova, I., et al., 2013). V této práci byla též zavedena a validována RealTime PCR metodika na stanovení exprese *HMOX* a *BLVRA* v jaterní tkáni a v periferních leukocytech (PBL). Hypotézy naší práce vycházely z výsledků této studie - exprese vybraných genů asociovaných s oxidačním stresem by měla být zvýšená ve vzorcích jaterní tkáně a v periferních leukocytech u pacientů s HCC v porovnání se zdravými kontrolami.

Cíle studie:

- 1) stanovit expresi genů katabolické dráhy hemu - *HMOX1*, *BLVRA*, *BLVRB* a dále *NOX2*, proteinu p22 a *VEGFA* v jaterní tkáni a v PBL pacientů s histologicky verifikovaným HCC a u zdravých kontrol;
- 2) prokázat korelaci mezi genovou expresí výše uvedených genů v játrech a v PBL pacientů s HCC.

V průběhu zpracování vzorků jsme si určili ještě následující dílčí cíle:

Porovnání exprese výše stanovených genů ve vzorcích jaterní tkáně u následujících skupin:

- a) pacienti s maligními nádory *versus* zdravé kontroly;
- b) pacienti s HBV a HCV infekcí *versus* zdravé kontroly;
- c) pacienti s HCC v terénu NASH *versus* pacienti s NASH bez prokázaného HCC.

3 METODICKÁ ČÁST

3.1 Charakteristika souboru

Studie byla prováděna u pacientů s ložiskovým postižením jater, tyto pacienti byli sledováni a léčeni v Ústřední vojenské nemocnici - Vojenské fakultní nemocnici Praha v letech 2011-2014.

Na základě zobrazovacích metod (CT, MR) a klinického vyšetření byla u pacientů indikována CT-navigovaná cílená biopsie ložiska před zahájením další léčby (n=53). U pacientů primárně indikovaných k resekci nádoru (n=6) se cílená biopsie neprováděla, materiál byl získán z resekátu. Dle výsledků histologického vyšetření byli pacienti rozděleni do dalších skupin.

Pacienti s HCC (n=33) byli dále léčeni dle stadia HCC s užitím BCLC klasifikace. Jednalo se o pacienty zařazené do stadia B a C. Pacienti stadia A a D nebyli k jaterní biopsii indikováni. Důvody k tomuto rozdělení pacientů jsou následující - u pacientů stadia A je indikována transplantace jater či resekce / ablace. Před těmito kurativními postupy není nutné provedení jaterní biopsie. U pacientů stadia D je indikována pouze symptomatická podpůrná léčba, jaterní biopsie těmto pacientům nepřináší žádný prospěch a proto je její provedení postupem *non lege artis*.

Ve skupině pacientů s odlišným histologickým nálezem (n=26) bylo potvrzeno jiné nádorové onemocnění ve 21 případech, u ostatních pacientů nebyly zjištěny nádorové buňky. Pacienti s verifikovaným nádorem byli léčeni dle typu daného nádorového onemocnění. Podrobný popis histologických nálezů a etiologie jaterního onemocnění je uveden v části Výsledky, Tabulka 4 a Tabulka 5. Do konečné analýzy všech měřených genových expresí bylo tedy zahrnuto 29 pacientů s histologicky potvrzeným HCC. Základní charakteristiky pacientů jsou uvedeny v Tabulce 3.

K analýze byly dále použity vzorky jaterní tkáně získané necílenou jaterní biopsií (n=38). Indikací k tomuto výkonu bylo stanovení stupně fibrózy či definitivní potvrzení diagnózy. Přehled všech histologických nálezů je uveden v Tabulce 6.

Jako kontrolní skupina vzorků ke stanovení genové exprese v jaterní tkáni byly vybrány necílené jaterní biopsie celkem 11 pacientů, u kterých byly v histologickém vyšetření prokázány minimální nebo žádné změny v jaterní tkáni (5 pacientů s NAFLD, 3 pacienti s minimálními změnami a 3 pacienti s normálním histologickým nálezem). Následně byla doplněna analýza u dalších vzorků v rámci dílčích cílů i u pacientů s virovými hepatitidami B a C a NASH.

Celkem bylo analyzováno 32 krevních vzorků pacientů s HCC, u 23 pacientů byl HCC histologicky verifikovaný, u 9 pacientů bez histologické verifikace byla diagnóza HCC stanovena pomocí zobrazovacích metod (CT a/nebo MR). Důvodem neprovedení cílené jaterní biopsie byl v těchto případech nesouhlas pacienta, dále pokročilost základního onemocnění či kontraindikace výkonu.

Do studie byly dále použity krevní vzorky zdravých dobrovolníků (n=27) – jednalo se o studenty a zaměstnance Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Práce byla provedena v souladu s principy Helsinské deklarace, všechny osoby zařazené do studie podepsaly informovaný souhlas, studie byla registrována v mezinárodní databázi www.clinicaltrials.gov pod ID: NCT 00842205.

3.2 Odběr a uchovávání vzorků

Jaterní biopsie

Jaterní biopsie byla prováděna standardní perkutánní aspirační technikou modifikovanou Menghiniho jehlou v případě necílené jaterní biopsie, cílené biopsie z ložisek pod CT kontrolou poté poloautomatickou tru-cut biopsickou jehlou Precisa. Do studie byly zařazeny vzorky biopsií, kde byla indikace k tomuto výkonu z důvodů diagnostického a terapeutického postupu. Dále byly do studie zařazeny vzorky jater získané z chirurgické resekce ložiska (6 pacientů), v tomto případě byl použit materiál o objemu max. 125 mm³. Část jaterní tkáně byla vložena do 10 % formalinu k histologickému vyšetření, další část byla ihned uložena do RNAlateru (Ambion Diagnostics, Austin, TX, USA) a skladována v -20°C.

Vzorky krve

Krev byla nabírána do PAXgene Blood RNA Tubes (PreAnalytix, Hombrechtikon, Switzerland) a poté skladována při -20°C do izolace RNA.

3.3 Chemikálie

Izolace RNA

Ethanol, 96% (Penta, Praha, ČR), Keramické částice (MagNA Lyser Green Beads, Roche GmbH, Německo), PAXgene Blood RNA Tubes (PreAnalytix, Hombrechtikon,

Switzerland), PAXgene kit (Qiagen, Dallas, TX, USA), RNA later (Ambion Diagnostics, Austin, TX, USA), RNeasy Mini Kit (Qiagen, Dallas, TX, USA)

Reverzní transkripce

Molecular Biology Grade Water (Eliphore, Alisabeth Pharmacon, Brno, ČR), High-Capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), RNase Inhibitor 5000 IU (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, ThermoScript™ Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

PCR

Primery (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR), PCR buffer (Fermentas Inc, Glen Burnie, Maryland, USA), SYBR Green Master Mix buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

3.4 Přístroje

- MagNA Lyser (Roche Diagnostics, Mannheim, SRN)
- Centrifuga Beckman GPR (Beckman, Fullerton, CA, USA)
- Centrifuga Jouan MR23i (Trigon-plus, Praha, ČR)
- Sonikátor XL (Microsonix incorporated, Farmingdale, NY, USA)
- Spektrofotometr ND-1000, NanoDrop® (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)
- Termocykler TC-512 (Techne, Burlington, NJ, USA)
- RealTime system ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- Sekvenátor CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)

3.5 Analytické metody

3.5.1 Izolace RNA

Vzorky jater

Jaterní tkáň byla po rozmrazení vyjmuta z RNAlateru, dále přidán lyzační roztok z kitu RNeasy Mini (Qiagen, Dallas, TX, USA) a bylo provedeno její mechanické rozrušení sonikátorem. Pomocí stejného kitu byla následně provedena izolace RNA. Kvalita a kvantita byla kontrolována spektrofotometricky. Poměr R260nm/280nm byl použit k posouzení čistoty vzorků.

Vzorky krve

Po rozmražení krve odebrané do PAXgene Blood RNA Tubes byla provedena izolace RNA pomocí PAXgene kit (Qiagen, Dallas, TX, USA). Kvalita a kvantita byla kontrolována spektrofotometricky. Poměr R260nm/280nm byl použit k posouzení čistoty vzorků.

3.5.2 Reverzní transkripce

cDNA byla syntetizována z 0.2µg celkové RNA ve finálním objemu 20µg za použití High-Capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) podle doporučení výrobce. Vzorky cDNA byly naředěny vodou (5x), validace vzorků byla provedena spektrofotometricky, následné skladování materiálu probíhalo při -20° C.

3.5.3 Stanovení genové exprese

Navržení primerů bylo realizováno pomocí programu Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), následně byly připraveny v Generi Biotech (Hradec Králové) (Tabulka 2).


Relativní exprese námi stanovených genů byla vztažena k HPRT (hypoxantin fosforibosyl transferáza) jako k interní kontrole. Validace HPRT jako interní kontroly byla provedena Ing. Subhanovou v práci Katalytická dráha hemu u chronické hepatitidy C (Subhanova, I., et al., 2013). qPCR bylo prováděno na celkovém objemu vzorku 20 µl.

Reakční směs

- 4 µl 5x zředěné cDNA získané při reverzní transkripci
- 1x SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- 200 nM (400 nM pro BLVRB, 1000 nM pro p22) forward a reverse primery

Vzorky byly analyzovány v 96 jamkové destičce v tripletech na ABI PRISM 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Rozdíl v expresi byl vypočten jako $2^{-\Delta\Delta ct}$. Podmínky PCR jsou uvedeny dále. Produkty PCR byly následně podrobeny analýze křivky tání.

Profil PCR

1. Úvodní denaturace 95°C 10 min
2. PCR
 - denaturace 95°C 15 s
 - annealing 60°C 60 s
 - bez extenze
3. Závěrečná extenze 72°C 10 min
4. Melting analýza 90-60 °C

Tabulka 2: Sekvence primerů pro genovou expresi

Geny	Forward primer	Reverse primer	Fragment (bp)
<i>HMOX1</i>	GGGTGATAGAAGAGGCCAAGA	TTTGAGGAGTTGCAGGAGCT	67
<i>BLVRA</i>	TCCCTCTTTGGGGAGCTTTC	GGACCCAGACTTGAAATGGAAG	180
<i>BLVRB</i>	CCACGTGGTAGTGGGAGATG	TCGTGGGACTGAGGTCATTG	110
<i>p22</i>	CTTCACCCAGTGGTACTTTGG	GGCGGTCATGTACTTCTGTCC	130
<i>NOX2</i>	GATTCTCTTGCCAGTCTGTCTG	ATTCCTGTCCAGTTGTCTTCG	94
<i>VEGFA</i>	ACTGAGGAGTCCAACATCACC	CTGCATTACATTTGTTGTGC	104
<i>HPRT</i>	CACTGGCAAAACAATGCAGAC	GGGTCCTTTTCACCAGCAAG	96

3.5.4 Biochemická analýza

Biochemické parametry (ALT, AST, GGT, ALP a bilirubin) byly stanoveny rutinní analýzou na automatickém analyzátoru Cobas R8000 Modular analyzer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Hematologické parametry byly také stanoveny na

automatickém analyzátoru – INR na ACL500 (Instrumentation Laboratory Bedford, Massachusetts, USA); hemoglobin a trombocyty na Sysmex XE-500 a XT-2000i (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

3.6 Statistická analýza

Vzhledem k nenormální distribuci jsou data popsána jako medián a IQ rozmezí. Korelace mezi expresí v játrech a v krvi byla provedena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Rozdíly mezi jednotlivými studovanými skupinami byly vyhodnoceny pomocí Mann-Whitneyho testu na hladině významnosti 0.05.

4 VÝSLEDKY

Celkem bylo zpracováno 59 vzorků jaterní tkáně získané cílenou biopsií či z resekátu, 38 vzorků jater z necílené jaterní biopsie. Krevní vzorky byly zpracovány u 32 pacientů s prokázaným HCC. Do konečné analýzy bylo také zahrnuto 27 krevních vzorků zdravých dobrovolníků.

Z 33 vzorků jaterní tkáně s histologicky potvrzeným HCC bylo do finální analýzy zahrnuto 29 vzorků (4 vzorky jater pravděpodobně znehodnoceny při zpracování, nebyly získány validní výsledky).

V analyzovaném souboru pacientů s HCC byl medián věku pacientů 69 let, HCC byl zachycen 4 x častěji u mužů než u žen. Základní laboratorní parametry pacientů jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Základní charakteristiky pacientů s HCC

	Počet (n=29)
pohlaví (poměr muži : ženy)	3,83
věk (roky)	69 (61,0 – 74,0)
celkový bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	15,3 (10,8 – 22,1)
ALT ($\mu\text{kat/l}$)	0,53 (0,4 – 0,8)
AST ($\mu\text{kat/l}$)	1,14 (0,8 – 1,6)
GGT ($\mu\text{kat/l}$)	2,9 (1,2 – 6,2)
ALP ($\mu\text{kat/l}$)	2,3 (1,7 – 4,4)
albumin	33,9 \pm 4,6
INR	1,22 (1,1 – 1,32)
hemoglobin (g/l)	121,1 \pm 19,1
trombocyty ($\times 10^9/\text{l}$)	203,5 \pm 94,1

data jsou vyjádřena jako průměr \pm standardní odchylka (SD), nebo medián (IQR)

Nejčastější příčinou vzniku HCC byla NASH, prokázaná u 10 pacientů, následovaná alkoholovým poškozením jater u 7 pacientů. U 3 pacientů se na vzniku jaterního onemocnění stejnou měrou podílel alkohol i NASH, proto jsme je ponechali v samostatné skupině. HCV se jako etiologická příčina jaterního onemocnění vyskytovala u 5 pacientů. V našem souboru byli dále 2 pacienti s HBV, u 1 pacienta se jednalo o hereditární hemochromatózu a u 1 pacienta

o fibrózu etiologicky blíže neurčenou. Celkem u 4 pacientů se neprokázala žádná jaterní choroba.

Tabulka 4: Etiologie jaterního onemocnění u pacientů s HCC

	Počet (n=33)
NASH	10
Alkoholová choroba jater	7
HCV	5
Bez jaterní léze	4
Kombinace NASH + alkoholové choroby jater	3
HBV	2
Fibróza (etiologicky blíže neurčená)	1
Hemochromatóza	1

Cílená jaterní biopsie byla indikována na základě CT či MR nálezu před zahájením léčby u celkem 53 pacientů s jedním či vícero ložisky jater, u 6 pacientů byla indikována primárně resekce ložiska. HCC byl potvrzen u 33 pacientů, celkem 26 pacientů mělo odlišný histologický nález. Dohromady u 5 pacientů se na základě histologického vyšetření nepotvrdilo žádné nádorové onemocnění – u 2 pacientů byla v histologickém nálezu popsána chronická HCV infekce, u 1 pacienta jaterní cirhóza a 2 pacienti měli jaterní biopsii bez nálezu maligních buněk či jiného zásadního patologického nálezu. Dále byly zachyceny 2 benigní nádory – angiomyolipom a hepatocelulární adenom. Mezi maligními nádory jater byl nejčastější cholangiocelulární karcinom (CCC) celkem u 10 pacientů. Poměrně často se jednalo o sekundární nádory jater – metastázy kolorektálního karcinomu u 3 pacientů, malobuněčného karcinomu u 2 pacientů a dlaždicobuněčného karcinomu u 1 pacienta. U 3 pacientů se objevily poměrně vzácné jaterní nádory – epiteloidní hemangioendoteliom, dále hemangiopericytom a solidní fibrózní tumor jater (s nízkým maligním potenciálem). Přehledně jednotlivé nálezy uvádí Tabulka 5.

Tabulka 5: Ostatní histologické nálezy mimo HCC

	Počet (n=26)
Cholangiocelulární karcinom	10
Metastáza kolorektálního karcinomu	3
Chronická HCV	2
Metastáza malobuněčného karcinomu	2
Bez nálezu maligních buněk	2
Metastáza dlaždicobuněčného karcinomu	1
Epiteloidní hemangioendoteliom	1
Solidní fibrózní tumor jater	1
Hemangiopericytom	1
Angiomyolipom	1
Hepatocelulární adenom	1
Nestabilizovaná jaterní cirhóza	1

Do analýzy byly zahrnuty vzorky jater celkem 38 pacientů, u nichž byla necílená jaterní biopsie prováděna ke stanovení definitivní diagnózy či stupně jaterní fibrózy. Mezi jednotlivými příčinami jaterního onemocnění byla stejnou měrou zastoupena HBV a HCV infekce, každá u 11 pacientů. U 5 pacientů byla potvrzena NASH, u 5 pacientů NAFLD. Celkem u 6 pacientů byly v jaterní biopsii zachyceny pouze minimální změny tkáně či normální jaterní tkáň. Tyto vzorky spolu s 5 vzorky pacientů s NAFLD byly vybrány jako kontrolní skupina, přehledně viz Tabulka 6.

Tabulka 6: Histologické nálezy v necílené jaterní biopsii

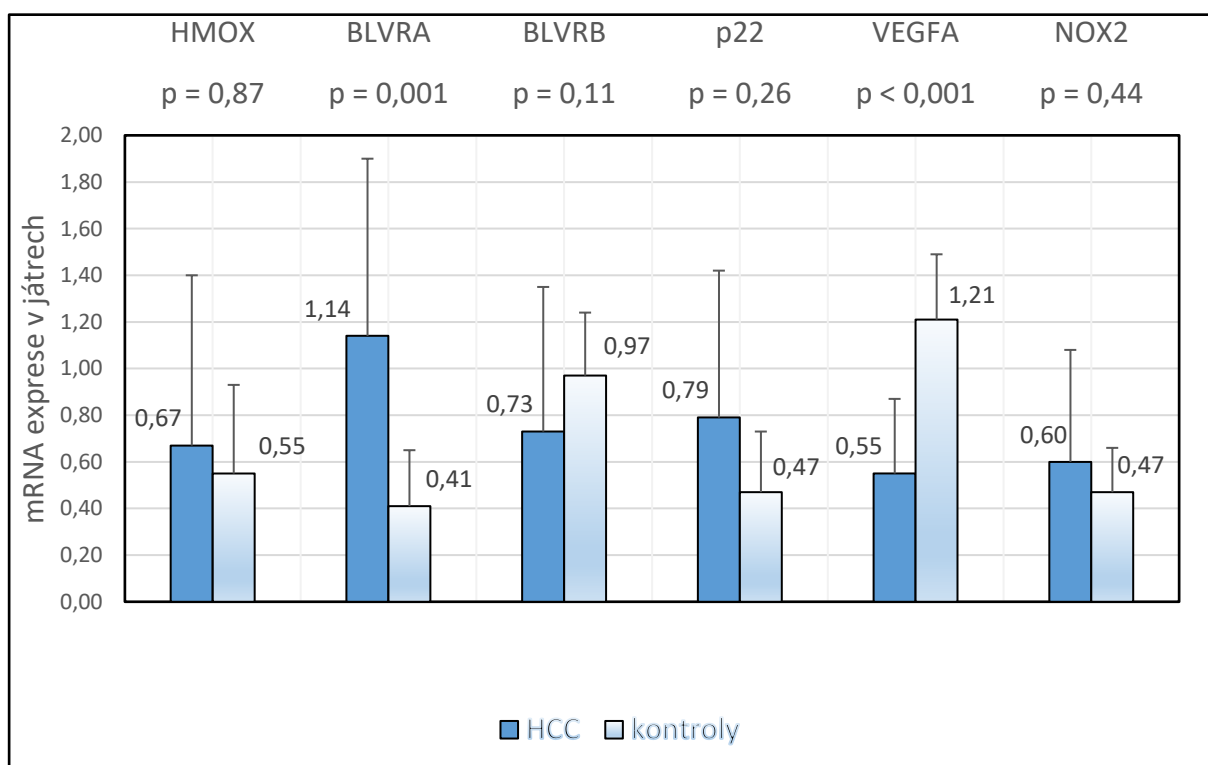
	Počet (n=38)
HBV	11
HCV	11
NASH	5
NAFLD	5
Normální tkáň	3
Minimální změny	3

Expresse sledovaných genů u nemocných s HCC

Expresse sledovaných genů ve vzorcích jaterní tkáně nemocných s HCC

Ve vzorcích jaterní tkáně pacientů s HCC ($n = 29$) byla zjištěna v porovnání s kontrolní skupinou ($n = 11$) významně zvýšená exprese BLVRA (1.14 ± 0.76 vs. 0.41 ± 0.024 , $p = 0.001$) a významně snížená exprese VEGFA (0.55 ± 0.32 vs. 1.21 ± 0.28 , $p < 0.001$). U ostatních sledovaných genů nebyl v jejich expresích zjištěn statisticky významný rozdíl (Obrázek 9).

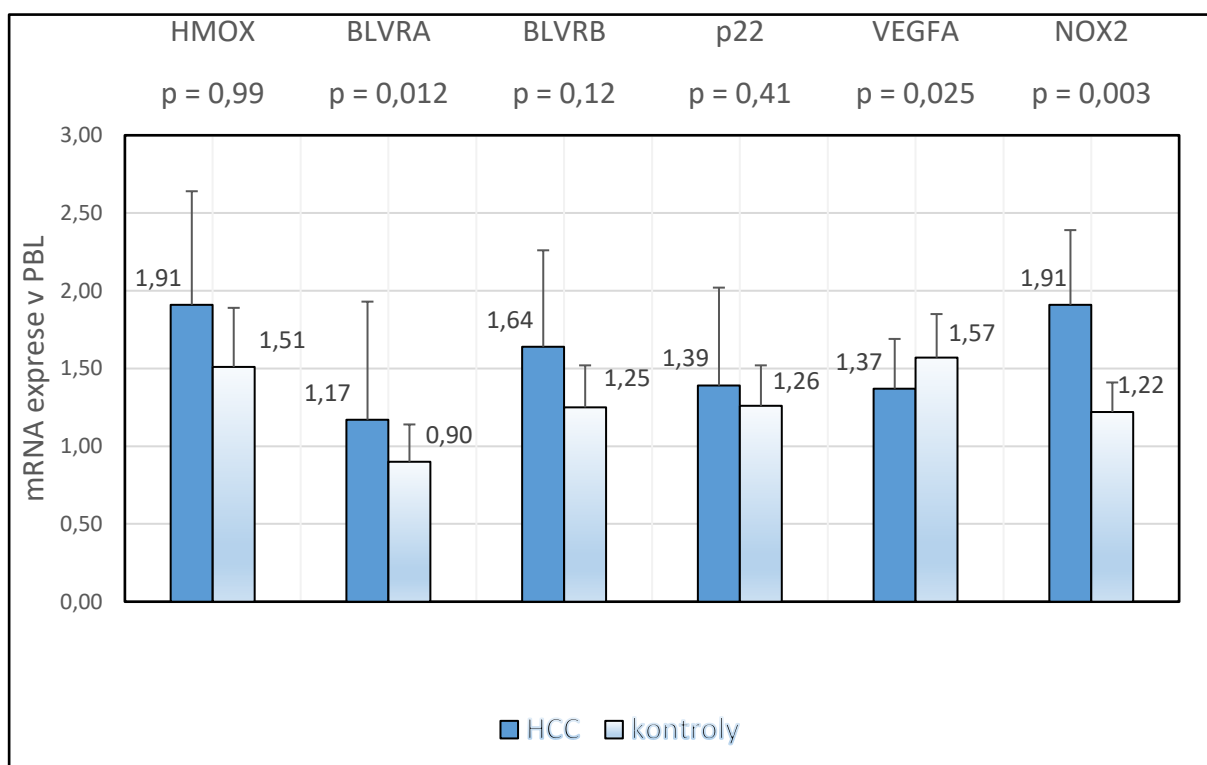
Obrázek 9: Genové exprese v játrech



Expresse sledovaných genů v PBL nemocných s HCC

Ve vzorcích PBL pacientů s HCC ($n = 32$) byla zjištěna v porovnání s kontrolní skupinou ($n = 27$) významně zvýšená exprese BLVRA (1.17 ± 0.46 vs. 0.90 ± 0.29 , $p = 0.012$), stejně tak jako exprese NOX2 (1.91 ± 1.21 vs. 1.22 ± 0.52 , $p = 0.003$). Podobně jako v jaterní tkáni byla v této skupině vzorků v porovnání s kontrolní skupinou významně snížena exprese VEGFA (1.37 ± 0.78 vs. 1.57 ± 0.51 , $p = 0.025$). U ostatních sledovaných genů nebyl v jejich expresích zjištěn statisticky významný rozdíl (Obrázek 10).

Obrázek 10: Genové exprese v PBL



Expresse sledovaných genů u maligních nádorů

Analýza exprese všech sledovaných genů byla dále provedena ve skupině vzorků zahrnující všechny typy maligních jaterních nádorů ($n = 39$) vs. selektované kontroly ($n = 11$). Do této skupiny byly zahrnuty primární maligní nádory jater (HCC a CCC) a jaterní metastázy. Ve shodě s předchozími výsledky byla zjištěna významně zvýšená exprese *BLVRA* (1.34 ± 0.98 vs. 0.41 ± 0.24 , $p < 0.001$). Expresse *VEGFA* byla významně snižena (0.60 ± 0.34 vs. 1.21 ± 0.28 , $p < 0.001$). U ostatních sledovaných genových expresí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl.

Ačkoli vyšetřovaný soubor nebyl příliš velký pro dílčí analýzy, pokusili jsme se porovnat exprese sledovaných genů u některých podskupiny nemocných.

Provedli jsme tedy srovnání exprese sledovaných genů ve vzorcích jater nemocných s HCC na podkladě virové hepatitidy B a C ($n = 22$) s kontrolními jedinci ($n = 11$). V této analýze byla zjištěna významně snižena exprese *VEGFA* (0.76 ± 0.29 vs. 1.21 ± 0.28 , $p < 0.001$), zatímco exprese ostatních sledovaných genů se nelišila. Při srovnání expresí sledovaných genů ve vzorcích jater pacientů s HCC na podkladě NASH ($n = 10$) se vzorky jater jedinců s NASH

(n = 5) nebyly zjištěny významné rozdíly. Možným důvodem by mohla být malá velikost výběrového souboru.

Korelace mezi sledovanými genovými expresemi v biopsiích HCC a odpovídajícími vzorky PBL

HMOX (n=17), BLVRA (n=17), p22 (n=18), VEGFA (n=18), NOX2 (n=18)

Žádná korelace mezi sledovanými genovými expresemi v játrech a krvi se neprokázala. Korelace exprese BLVRA v játrech a PBL je zřejmá, nicméně statisticky nevýznamná ($p=0,21$), což může být způsobeno velmi slabou silou statistického testu (0,236). Na takto malém souboru jsme tedy nebyli schopni korelaci statisticky potvrdit.

5 DISKUZE

Jaterní kancerogeneze je komplexní proces, který není dosud zcela prozkoumán. Nicméně bylo již opakovaně popsáno, že zvýšení oxidačního stresu či naopak nefunkčnost antioxidačních systémů významně přispívá ke vzniku a progresi HCC (Choi, J., et al., 2014).

První publikovaná práce, demonstrující jednoznačný vliv oxidačního stresu v procesu karcinogeneze, prokázala transformaci myších fibroblastů (Kensler, T. W., Trush, M. A., 1984). Tento koncept byl opakovaně prokázán dalšími pracemi, například na zvířecím modelu u SOD deficientních myši je popisován zvýšený výskyt HCC (Elchuri, S., et al., 2005). U dalšího zvířecího modelu, který využíval nukleární respirační faktor 1 (NRF1) deficientní myši, došlo k indukci steatózy, fibrózy a HCC (Xu, Z., et al., 2005). NRF1 je transkripční faktor ovlivňující funkci mnoha genů, včetně těch zapojených do regulace oxidačního stresu. Bylo například prokázáno, že významně ovlivňuje množství hemu pro cytochromy dýchacího řetězce pomocí regulace exprese 5-ALA syntázy, klíčového enzymu v syntéze hemu (Braidotti, G., et al., 1993).

Vliv oxidačního stresu na jaterní kancerogenezi potvrzují také výsledky multicentrické studie u pacientů po resekci HCC, kdy snížená exprese cytochromu P4501A2 v jaterní tkáni byla identifikována jako prediktivní faktor rekurence HCC po operaci (Tanaka, S., et al., 2011).

V klinické praxi je dobře znám vliv přetížení železem u pacientů s hereditární hemochromatózou na indukci oxidačního stresu a potenciaci karcinogeneze, kdy jedním z mechanismů je nadprodukce reaktivních hydroxylových radikálů, vznikajících při Fentonově reakci (Marrogi, A. J., et al., 2001).

Dalším příkladem z praxe je nadměrná produkce ROS u pacientů s NAFLD, které vznikají během oxidativní fosforylace díky mitochondriálním změnám (Paradies, G., et al., 2014).

Obdobně také u chronické HCV infekce dochází díky zvýšení oxidačního stresu k potenciaci kancerogeneze (Tsukiyama-Kohara, K., 2012).

Stejně tak byla popsána úloha NOX, hlavního producenta superoxidu v mitochondriích, při patogenezi jaterní fibrózy a karcinogenezi vyvolané TGF- β (Crosas-Molist, E., et al., 2015). V této souvislosti je zajímavé poznamenat, že bilirubin, jedna z nejdůležitějších endogenních antioxidačních látek (Pal, S., et al., 2010), je silným inhibitorem NOX (Fujii, M., et al., 2010; Lanone, S., et al., 2005).

Oxidační stres je tedy klíčovým faktorem iniciace a progresu jaterní kancerogeneze za různých patologických podmínek, respektive u různých jaterních chorob (Fu, Y., Chung, F. L., 2018; Sasaki, Y., 2006).

Katabolická dráha hemu, dříve považována pouze za metabolickou dráhu odstraňující hem a jeho metabolity z organismu, hraje důležitou roli v ochraně před zvýšeným oxidačním stresem (Vitek, L., Schwertner, H. A., 2007). Úloha HMOX1 v karcinogenezi je nadále kontroverzní. Zatímco například u karcinomu pankreatu byla zvýšená exprese *HMOX 1* negativním prognostickým faktorem ovlivňujícím odpověď na léčbu (Berberat, P. O., et al., 2005), jiné klinické studie ukazují, že u pacientů s aktivnější variantou genu *HMOX1* je méně pravděpodobné, že se u nich vyvinou zhoubná nádorová onemocnění (Exner, M., et al., 2004). Protektivní role HMOX1 byla popsána na zvířecím modelu jaterní karcinogeneze, kdy snížení exprese *HMOX1* vedlo ke zvýšenému počtu malignit (Caballero, F., et al., 2004).

V naší práci jsme neprokázali, že by byla *HMOX1* rozdílně exprimována u pacientů s HCC, ani v játrech či v periferních leukocytech.

Expres *BLVRA* však byla u těchto pacientů významně zvýšena, a to jak v nádorové tkáni, tak i v PBL. Tato zjištění jsou ve shodě s publikovanými výsledky De Giorgiho a kol., na souboru pacientů s HCC v terénu HCV infekce. Cílem této práce bylo identifikovat potenciální biomarkery pro včasnou diagnostiku HCC, mimo jiné bylo prokázáno zvýšení exprese *BLVRA* na téměř dvojnásobek v porovnání s normální jaterní tkání (De Giorgi, V., et al., 2013).

V naší předchozí práci na souboru HCV infikovaných pacientů byla prokázána významně zvýšená exprese *BLVRA* v periferních leukocytech, korelující s expresí *BLVRA* v jaterní tkáni. Bazální exprese *BLVRA* byla zvýšená u pacientů reagujících na protivirovou léčbu ve srovnání se zdravými kontrolami a pacienty na léčbu rezistentními. Navíc bylo zjištěno další zvýšení exprese *BLVRA* v průběhu protivirové terapie. Expres *BLVRA* se tak ukázala být nezávislým prediktorem setrvalé virologické odpovědi (Subhanova, I., et al., 2013).

Další práce potvrzující naše výsledky byla publikována u pacientů s melanomem, kdy byla zjištěna zvýšená exprese *BLVR* v nádorové tkáni (Arena, V., et al., 2015). Nadměrná exprese *BLVRA* byla popsána u vaginálních karcinomů (Hellman, K., et al., 2009), dále také u renálních karcinomů, a to jak v tkáňových kulturách (Miralem, T., et al., 2005), tak i ve vzorcích pacientů (Maines, M. D., et al., 1999).

Práce autorů Melle a kol., prokazovala zvýšení exprese také druhého izoenzymu biliverdinreduktázy, *BLVRB* (Melle, C., et al., 2007). Potenciálně prokarcinogenní efekt tohoto enzymu byl popsán v experimentální práci Huana a kol. (Huan, L., et al., 2015). Naše výsledky však prokázaly pouze mírné, statisticky nevýznamné zvýšení exprese *BLVRB* u pacientů s HCC v porovnání s kontrolními jedinci.

Význam zvýšení exprese *BLVRA* může být vysvětlen několika způsoby. Mohlo by se jednat o zpětnou stimulaci antioxidačními systémy, což pravděpodobně také funguje u HCV infikovaných pacientů, jak jsme prokázali v naší předchozí práci. Pacienti se setrvalou virologickou odpovědí měli mnohem vyšší expresi *BLVRA* v porovnání s non-respondéry na léčbu (Subhanova, I., et al., 2013). Tuto hypotézu dále potvrzuje příznivý efekt *BLVRA* v prevenci stárnutím navozeného oxidačního stresu (Kim, S. Y., et al., 2011).

Na druhou stranu byla popsána RNA interference v experimentu na buňkách renálního karcinomu, kdy genový silencing *BLVRA* měl proapoptotický efekt (Miralem, T., et al., 2005).

BLVRA je známý aktivátor mnoha proliferačních intracelulárních signálních drah (Gibbs, P. E., et al., 2015) a je také senzorem intracelulární hypoxie, kdy se jeho exprese v reakci na hypoxii významně zvyšuje (Kim, S. S., et al., 2013). Zdá se tedy, že ke zvýšení exprese *BLVRA* v klinických i experimentálních pracích vede vícero mechanismů.

Nicméně i přesto se zdá naše vysvětlení dostatečně pravděpodobné – tj. ke zvýšené expresi *BLVRA* dochází v důsledku zvýšeného oxidačního stresu. Dokládá to také zvýšená exprese *NOX2* v PBL pacientů s HCC. Zvýšení exprese *BLVRA* může tak působit jako mechanismus zpětné vazby k vychytávání superoxidu nadprodukovaného zvýšeným *NOX2* (Choi, J., et al., 2014).

V naší práci jsme prokázali významně sníženou expresi *VEGFA* u pacientů s HCC v játrech i v krvi. *VEGFA* hraje významnou roli v nádorové angiogenezi, exprese *VEGFA* a potažmo míra vaskularizace nádoru koreluje s nepříznivou prognózou (Salven, P., et al., 1998). Inhibice angiogeneze je součástí protinádorové léčby a předmětem intenzivního výzkumu. Zvýšená exprese *VEGFA* je například přesvědčivým prognostickým ukazatelem u pacientů s karcinomem pankreatu, korelující s maligním potenciálem nádoru (Smith, R. A., et al., 2011). Na myším modelu a poté i u pacientů byla popsána amplifikace *VEGFA*, která byla spojena s vyšší citlivostí k terapii sorafenibem (Horwitz, E., et al., 2014). Tyto změny byly popsány jen u 11 % vyšetřených pacientů, je tedy otázkou další využití pro praxi – nabízí se identifikace skupiny pacientů vhodných k zahájení včasné léčby sorafenibem. Opět to dokazuje velkou heterogenitu HCC, výhledově s nutností znalosti genetického profilu nádoru a individualizaci léčby pacienta. Pro využití stanovení exprese *VEGFA* jako prognostického faktoru (efekt léčby, doba přežití) v rutinní praxi není dostatek dat.

V případě HCC byl popsán vliv velikosti nádoru a stupně jeho diferenciaci na expresi *VEGFA*, exprese se snižovala u dediferencovaných nádorů a nádorů větších než 3 cm (Yamaguchi, R., et al., 1998). Podle recentních studií se ukazuje, že exprese *VEGFA* je zvýšená na začátku kancerogeneze, respektive u malých tumorů bez vaskulární invaze; v pokročilých stádiích s vaskulární angioinvasí či s multilokulárním postižením jater pak klesá (Fodor, D., et al., 2019). Pokud byl ve studiích k dispozici materiál nejen z vlastního nádoru, ale také biopsie z okrajů resekátu, byla popsána významně vyšší exprese *VEGFA* v okolní tkáni tumoru. Také byla zjištěna zvýšená exprese i ostatních markerů angiogeneze - VEGF-C a VEGFR 1, 2 a 3 (receptory pro VEGF) (Chen, F., et al., 2015). Vysvětlením je pravděpodobně nejen oscilace angiogeneze, ale také rozdílný mechanismus angiogeneze v různých fázích vzniku a růstu nádoru. Tato zjištění by mohla být ve shodě s našimi výsledky – vyjma jednoho pacienta byli všichni ostatní pacienti s potvrzeným HCC v naší studii stadia B a C dle BCLC klasifikace, tj. intermediární a pokročilé stádium. Jedná se tedy o pacienty s pokročilým HCC, kdy je možná pouze paliativní terapie, ať už chemoembolizací nádoru či systémovou chemoterapií. Problematické je jistě porovnávání s výsledky studií, kdy je materiál získáván z resekátu nádoru, v případě naší práce se pak jednalo o nádorovou tkáň z cílených biopsií tumoru, kdy je hodnocení často ztíženo nekrotickými změnami.

Obecně je vyšetření genetických mutací nádoru velmi problematické a to hned z několika hledisek. Naprostá většina studií se opírá o vyšetření vzorků jaterní tkáně získané resekci, tudíž se tedy jedná o HCC velmi časného nebo časného stádia, kdy je provedena resekce HCC a nebo transplantace jater. Je tedy otázkou, zda jsou výsledky genetického profilování těchto málo pokročilých HCC validní pro jiná stádia nádoru a použitelná v praxi. Dalším problémem je vývoj jednotlivých mutací v průběhu vzniku HCC, nevíme tedy, zda jsou výsledky platné a použitelné během celé délky nádorového onemocnění (Villanueva, A., 2019). U HCC je kromě intratumorové heterogenity známá také intertumorová heterogenita, kdy dochází ke vzniku několika geneticky odlišných nádorových ložisek ve stejných játrech. Dle dostupných výsledků studií zkoumajících klonalitu multimodálních nádorů se jedná o metastázy u 20 – 40 % pacientů, v ostatních případech jde o *de novo* vzniklé nádory v cirhotickém terénu (An, F. Q., et al., 2001; Furuta, M., et al., 2017; Chen, Y. J., et al., 2000). Tyto výsledky by mohly vysvětlovat primární a sekundární rezistenci na systémovou léčbu. Zavedení vyšetření genetického podtypu nádoru do rutinní praxe a jeho začlenění do stagingu povede k přesnějšímu určení léčebné modalit, ať už v podobě adjuvantní terapie pro rizikové skupiny pacientů či určení optimální sekvence systémové léčby.

Je na místě také zdůraznit význam PBL jako biologického materiálu, který má být použit pro studium genové exprese. Odběr tohoto materiálu je snadný, také výsledky genové exprese jsou ve srovnání s výsledky z jaterní tkáně spolehlivější. Hodnocení genové exprese specificky ve vzorku karcinomu jater navíc často komplikuje přítomnost nekrotické tkáně (Kim, S. S., et al., 2013).

Další možností by mohlo být stanovení cirkulujících miRNA v krvi, u některých jako např. miRNA-18a, miRNA-221 a miRNA-22 byla již asociace s HCC popsána (Zhang, C., et al., 2012). Studie kandidátních miRNA jako markerů HCC v současnosti probíhá v Hepatologické laboratoři ÚLBD 1. LF UK.

6 ZÁVĚR

HCC je celosvětově velmi časté nádorové onemocnění, v globálním kontextu se pohybuje na předních příčkách příčin úmrtí v důsledku maligního onemocnění. Vzhledem k jeho výskytu prakticky téměř vždy v terénu jaterní choroby je dobře známá riziková populace pro vznik tohoto nádoru. Efektivita screeningu je přes dostupnost ultrasonografie jater nedostatečná. V současné době žádný ze zavedených onkomarkerů nezvyšuje efekt screeningu. Příčinou by mohla být velká heterogenita HCC a rozdílné mechanismy kancerogeneze u jednotlivých jaterních chorob.

Naším cílem bylo tedy stanovit expresi genů katabolické dráhy hemu - *HMOX1*, *BLVRA*, *BLVRB* a dále *NOX2*, genu kódujícího protein p22 a *VEGFA* v jaterní tkáni a v periferních leukocytech pacientů s histologicky verifikovaným HCC a u zdravých kontrol.

Výsledky ukázaly zvýšenou expresi *BLVRA* v játrech a PBL u HCC pacientů, což by mohl být mechanismus zpětné vazby pro kontrolu zvýšeného oxidačního stresu spojeného s progresí HCC, doprovázený také zvýšením exprese *NOX2* v PBL těchto pacientů.

Ve shodě s těmito zjištěními byla zjištěna zvýšená exprese *BLVRA* u všech maligních jaterních nádorů v našem souboru.

Korelaci mezi genovou expresí výše uvedených genů v játrech a v PBL pacientů s HCC jsme neprokázali. Také nebyl zjištěn rozdíl mezi expresí daných genů ve skupině s virovými hepatitidami B a C, ani ve skupině pacientů s NASH.

Hodnocení genové exprese konkrétně u HCC je ztíženo prakticky téměř vždy přítomnou nekrózou nádorové tkáně, PBL je tedy vhodným biologickým materiálem pro studium genové exprese poskytujícím spolehlivé výsledky.

Tato data jsou ve shodě s výsledky naší předchozí studie provedené na nemocných s chronickou hepatitidou C, u nichž byla exprese *BLVRA* také zvýšena. Zvýšená exprese *BLVRA* u pacientů s HCC, chronickou hepatitidou C a patrně i dalšími závažnými onemocněními jater tak představuje slibný diagnostický či prognostický marker, který by mohl nalézt uplatnění v klinické medicíně.

7 LITERATURA

1. Abou-Alfa, G.K., Meyer, T., Cheng, A.L., et al. Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*, 2018. 379(1): p. 54-63.
2. Agarwal, M.L., Agarwal, A., Taylor, W.R., et al. A p53-dependent S-phase checkpoint helps to protect cells from DNA damage in response to starvation for pyrimidine nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(25): p. 14775-80.
3. Ahn, S.M., Jang, S.J., Shim, J.H., et al. Genomic portrait of resectable hepatocellular carcinomas: implications of RB1 and FGF19 aberrations for patient stratification. *Hepatology*, 2014. 60(6): p. 1972-82.
4. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004. 431(7006): p. 350-5.
5. An, F.Q., Matsuda, M., Fujii, H., et al. Tumor heterogeneity in small hepatocellular carcinoma: analysis of tumor cell proliferation, expression and mutation of p53 AND beta-catenin. *Int J Cancer*, 2001. 93(4): p. 468-74.
6. Arakawa, M., Kage, M., Sugihara, S., et al. Emergence of malignant lesions within an adenomatous hyperplastic nodule in a cirrhotic liver. Observations in five cases. *Gastroenterology*, 1986. 91(1): p. 198-208.
7. Arena, V., Pennacchia, I., Guerriero, G., Mancuso, C. The heme oxygenase/biliverdin reductase system in skin cancers. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2015. 29(1): p. 259-64.
8. Arzumanyan, A., Reis, H.M., Feitelson, M.A. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Cancer*, 2013. 13(2): p. 123-35.
9. Ayala, A., Munoz, M.F., Arguelles, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014. 2014: p. 360438.
10. Babior, B.M. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*, 2004. 16(1): p. 42-7.
11. Bachmann, S., Ramasubbu, K. Immunohistochemical colocalization of the alpha-subunit of neutrophil NADPH oxidase and ecto-5'-nucleotidase in kidney and liver. *Kidney Int*, 1997. 51(2): p. 479-82.
12. Bannister, J.V., Bannister, W.H., Rotilio, G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem*, 1987. 22(2): p. 111-80.
13. Beasley, R.P., Hwang, L.Y., Lin, C.C., Chien, C.S. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet*, 1981. 2(8256): p. 1129-33.

14. Bedard, K., Krause, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 2007. 87(1): p. 245-313.
15. Bellentani, S., Pozzato, G., Saccoccio, G., et al. Clinical course and risk factors of hepatitis C virus related liver disease in the general population: report from the Dionysos study. *Gut*, 1999. 44(6): p. 874-80.
16. Berberat, P.O., Dambrauskas, Z., Gulbinas, A., et al. Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(10): p. 3790-8.
17. Bertuccio, P., Turati, F., Carioli, G., et al. Global trends and predictions in hepatocellular carcinoma mortality. *J Hepatol*, 2017. 67(2): p. 302-309.
18. Bhojani, N., Jeldres, C., Patard, J.J., et al. Toxicities associated with the administration of sorafenib, sunitinib, and temsirolimus and their management in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Eur Urol*, 2008. 53(5): p. 917-30.
19. Bilzer, M., Roggel, F., Gerbes, A.L. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int*, 2006. 26(10): p. 1175-86.
20. Biselli, M., Conti, F., Gramenzi, A., et al. A new approach to the use of alpha-fetoprotein as surveillance test for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Br J Cancer*, 2015. 112(1): p. 69-76.
21. Bjarnason, I., Peters, T.J., Wise, R.J. The leaky gut of alcoholism: possible route of entry for toxic compounds. *Lancet*, 1984. 1(8370): p. 179-82.
22. Boyault, S., Rickman, D.S., de Reynies, A., et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*, 2007. 45(1): p. 42-52.
23. Braidotti, G., Borthwick, I.A., May, B.K. Identification of regulatory sequences in the gene for 5-aminolevulinate synthase from rat. *J Biol Chem*, 1993. 268(2): p. 1109-17.
24. Brantjes, H., Barker, N., van Es, J., Clevers, H. TCF: Lady Justice casting the final verdict on the outcome of Wnt signalling. *Biol Chem*, 2002. 383(2): p. 255-61.
25. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2018. 68(6): p. 394-424.
26. Brooks, P.J. DNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity--a review. *Alcohol Clin Exp Res*, 1997. 21(6): p. 1073-82.

27. Bruix, J., Qin, S., Merle, P., et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 2017. 389(10064): p. 56-66.
28. Bruix, J., Sherman, M., American Association for the Study of Liver, D. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*, 2011. 53(3): p. 1020-2.
29. Burrel, M., Reig, M., Forner, A., et al. Survival of patients with hepatocellular carcinoma treated by transarterial chemoembolisation (TACE) using Drug Eluting Beads. Implications for clinical practice and trial design. *J Hepatol*, 2012. 56(6): p. 1330-5.
30. Burza, M.A., Pirazzi, C., Maglio, C., et al. PNPLA3 I148M (rs738409) genetic variant is associated with hepatocellular carcinoma in obese individuals. *Dig Liver Dis*, 2012. 44(12): p. 1037-41.
31. Caballero, F., Meiss, R., Gimenez, A., et al. Immunohistochemical analysis of heme oxygenase-1 in preneoplastic and neoplastic lesions during chemical hepatocarcinogenesis. *Int J Exp Pathol*, 2004. 85(4): p. 213-221.
32. Cainap, C., Qin, S., Huang, W.T., et al. Linifanib versus Sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol*, 2015. 33(2): p. 172-9.
33. Caldwell, S.H., Crespo, D.M., Kang, H.S., Al-Osaimi, A.M. Obesity and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2004. 127(5 Suppl 1): p. S97-103.
34. Capurro, M., Wanless, I.R., Sherman, M., et al. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2003. 125(1): p. 89-97.
35. Carmeliet, P., Jain, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000. 407(6801): p. 249-57.
36. Clark, T.W. Complications of hepatic chemoembolization. *Semin Intervent Radiol*, 2006. 23(2): p. 119-25.
37. Colombo, M. Screening for cancer in viral hepatitis. *Clin Liver Dis*, 2001. 5(1): p. 109-22.
38. Colombo, M., Maisonneuve, P. Controlling liver cancer mortality on a global scale: Still a long way to go. *J Hepatol*, 2017. 67(2): p. 216-217.
39. Cooper, A., Tal, G., Lider, O., Shaul, Y. Cytokine induction by the hepatitis B virus capsid in macrophages is facilitated by membrane heparan sulfate and involves TLR2. *J Immunol*, 2005. 175(5): p. 3165-76.

40. Cougot, D., Neuveut, C., Buendia, M.A. HBV induced carcinogenesis. *J Clin Virol*, 2005. 34 Suppl 1: p. S75-8.
41. Crosas-Molist, E., Bertran, E., Fabregat, I. Cross-Talk Between TGF-beta and NADPH Oxidases During Liver Fibrosis and Hepatocarcinogenesis. *Curr Pharm Des*, 2015. 21(41): p. 5964-76.
42. Cucchetti, A., Piscaglia, F., Cescon, M., et al. Cost-effectiveness of hepatic resection versus percutaneous radiofrequency ablation for early hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 2013. 59(2): p. 300-7.
43. Cunningham, O., Gore, M.G., Mantle, T.J. Initial-rate kinetics of the flavin reductase reaction catalysed by human biliverdin-IXbeta reductase (BVR-B). *Biochem J*, 2000. 345 Pt 2: p. 393-9.
44. Dapito, D.H., Mencin, A., Gwak, G.Y., et al. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer Cell*, 2012. 21(4): p. 504-16.
45. Davies, K.J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem*, 1987. 262(20): p. 9895-901.
46. De Giorgi, V., Buonaguro, L., Worschech, A., et al. Molecular signatures associated with HCV-induced hepatocellular carcinoma and liver metastasis. *PLoS One*, 2013. 8(2): p. e56153.
47. de Lope, C.R., Tremosini, S., Forner, A., et al. Management of HCC. *J Hepatol*, 2012. 56 Suppl 1: p. S75-87.
48. De Mitri, M.S., Poussin, K., Baccarini, P., et al. HCV-associated liver cancer without cirrhosis. *Lancet*, 1995. 345(8947): p. 413-5.
49. de Mochel, N.S., Seronello, S., Wang, S.H., et al. Hepatocyte NAD(P)H oxidases as an endogenous source of reactive oxygen species during hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 2010. 52(1): p. 47-59.
50. de Oliveria Andrade, L.J., D'Oliveira, A., Melo, R.C., et al. Association between hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *J Glob Infect Dis*, 2009. 1(1): p. 33-7.
51. Di Bisceglie, A.M., Sterling, R.K., Chung, R.T., et al. Serum alpha-fetoprotein levels in patients with advanced hepatitis C: results from the HALT-C Trial. *J Hepatol*, 2005. 43(3): p. 434-41.
52. Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med*, 2002. 32(11): p. 1102-15.
53. Dolphin, D. The Porphyrins. 1978: Academic Press.

54. Dusek, L., Muzik, J., Maluskova, D., Gregor, J. [Epidemiology of cancers with implemented screening programmes in an international comparison]. *Klin Onkol*, 2014. 27 Suppl 2: p. 40-8.
55. Dutra, F.F., Bozza, M.T. Heme on innate immunity and inflammation. *Front Pharmacol*, 2014. 5: p. 115.
56. EASL-EASD-EASO EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*, 2016. 64(6): p. 1388-402.
57. EASL-EORTC EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer*, 2012. 48(5): p. 599-641.
58. Edamoto, Y., Hara, A., Biernat, W., et al. Alterations of RB1, p53 and Wnt pathways in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C, hepatitis B and alcoholic liver cirrhosis. *Int J Cancer*, 2003. 106(3): p. 334-41.
59. El-Khoueiry, A.B., Sangro, B., Yau, T., et al. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet*, 2017. 389(10088): p. 2492-2502.
60. El-Serag, H.B. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2012. 142(6): p. 1264-1273 e1.
61. El-Serag, H.B. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 2011. 365(12): p. 1118-27.
62. El-Serag, H.B., Rudolph, K.L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 2007. 132(7): p. 2557-76.
63. Elchuri, S., Oberley, T.D., Qi, W., et al. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene*, 2005. 24(3): p. 367-80.
64. Erhardt, A., Kolligs, F., Dollinger, M., et al. TACE plus sorafenib for the treatment of hepatocellular carcinoma: results of the multicenter, phase II SOCRATES trial. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2014. 74(5): p. 947-54.
65. Exner, M., Minar, E., Wagner, O., Schillinger, M. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Rad Biol Med*, 2004. 37(8): p. 1097-1104.
66. Farazi, P.A., DePinho, R.A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(9): p. 674-87.
67. Farinati, F., Cardin, R., De Maria, N., et al. Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. *J Hepatol*, 1995. 22(4): p. 449-56.

68. Farinati, F., Sergio, A., Baldan, A., et al. Early and very early hepatocellular carcinoma: when and how much do staging and choice of treatment really matter? A multi-center study. *BMC Cancer*, 2009. 9: p. 33.
69. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 2015. 136(5): p. E359-86.
70. Fodor, D., Jung, I., Turdean, S., et al. Angiogenesis of hepatocellular carcinoma: An immunohistochemistry study. *World J Hepatol*, 2019. 11(3): p. 294-304.
71. Forner, A., Vilana, R., Ayuso, C., et al. Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2008. 47(1): p. 97-104.
72. Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S., et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, 1986. 323(6089): p. 643-6.
73. Fu, Y., Chung, F.L. Oxidative stress and hepatocarcinogenesis. *Hepatoma Res*, 2018. 4.
74. Fujii, M., Inoguchi, T., Sasaki, S., et al. Bilirubin and biliverdin protect rodents against diabetic nephropathy by downregulating NAD(P)H oxidase. *Kidney Int*, 2010. 78(9): p. 905-919.
75. Fuks, D., Cauchy, F., Fusco, G., et al. Preoperative tumour biopsy does not affect the oncologic course of patients with transplantable HCC. *J Hepatol*, 2014. 61(3): p. 589-93.
76. Furuta, M., Ueno, M., Fujimoto, A., et al. Whole genome sequencing discriminates hepatocellular carcinoma with intrahepatic metastasis from multi-centric tumors. *J Hepatol*, 2017. 66(2): p. 363-373.
77. Galle P.R., F.R.S., Qin S., Masafumi M., et al. Patient-reported outcomes (PROs) from the Phase III IMbrave150 trial of atezolizumab (atezo) + bevacizumab (bev) vs sorafenib (sor) as first-line treatment (tx) for patients (pts) with unresectable hepatocellular carcinoma (HCC). *Journal of Clinical Oncology*, 2020. 38.
78. Galle, P.R., Forner, A., Llovet, J.M., et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 2018. 69(1): p. 182-236.
79. Gherardi, E., Birchmeier, W., Birchmeier, C., Vande Woude, G. Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat Rev Cancer*, 2012. 12(2): p. 89-103.

80. Gibbs, P.E., Miralem, T.,Maines, M.D. Biliverdin reductase: a target for cancer therapy? *Front Pharmacol*, 2015. 6: p. 119.
81. Global Burden of Disease Liver Cancer, C., Akinyemiju, T., Abera, S., et al. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA Oncol*, 2017. 3(12): p. 1683-1691.
82. Greenwald, R.J., Freeman, G.J.,Sharpe, A.H. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*, 2005. 23: p. 515-48.
83. Greider, C.W.,Blackburn, E.H. The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell*, 1987. 51(6): p. 887-98.
84. Guichard, C., Amaddeo, G., Imbeaud, S., et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, 2012. 44(6): p. 694-8.
85. Halliwell, B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem Soc Trans*, 1996. 24(4): p. 1023-7.
86. Harrison, D., Griendling, K.K., Landmesser, U., et al. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol*, 2003. 91(3A): p. 7A-11A.
87. Hassan, M., Selimovic, D., Ghozlan, H.,Abdel-kader, O. Hepatitis C virus core protein triggers hepatic angiogenesis by a mechanism including multiple pathways. *Hepatology*, 2009. 49(5): p. 1469-82.
88. Heimbach, J.K., Kulik, L.M., Finn, R.S., et al. AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2018. 67(1): p. 358-380.
89. Hellman, K., Alaiya, A.A., Becker, S., et al. Differential tissue-specific protein markers of vaginal carcinoma. *Br J Cancer*, 2009. 100(8): p. 1303-14.
90. Hensley, K., Robinson, K.A., Gabbita, S.P., et al. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med*, 2000. 28(10): p. 1456-62.
91. Hicklin, D.J.,Ellis, L.M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*, 2005. 23(5): p. 1011-27.
92. Hilgard, P., Hamami, M., Fouly, A.E., et al. Radioembolization with yttrium-90 glass microspheres in hepatocellular carcinoma: European experience on safety and long-term survival. *Hepatology*, 2010. 52(5): p. 1741-9.

93. Hino, K., Nishina, S., Hara, Y. Iron metabolic disorder in chronic hepatitis C: mechanisms and relevance to hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013. 28 Suppl 4: p. 93-8.
94. Hirsova, P., Ibrahim, S.H., Gores, G.J., Malhi, H. Lipotoxic lethal and sublethal stress signaling in hepatocytes: relevance to NASH pathogenesis. *J Lipid Res*, 2016. 57(10): p. 1758-1770.
95. Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M.S., et al. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*, 1994. 22(17): p. 3551-5.
96. Horwitz, E., Stein, I., Andreozzi, M., et al. Human and mouse VEGFA-amplified hepatocellular carcinomas are highly sensitive to sorafenib treatment. *Cancer Discov*, 2014. 4(6): p. 730-43.
97. Hoshida, Y., Fuchs, B.C., Bardeesy, N., et al. Pathogenesis and prevention of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 2014. 61(1 Suppl): p. S79-90.
98. Houwert, A.C., Giltay, J.C., Lentjes, E.G., Lock, M.T. Hereditary persistence of alpha-fetoprotein (HPAF P): review of the literature. *Neth J Med*, 2010. 68(11): p. 354-8.
99. Hribek, P., Kubickova, K., Parobkova, H., et al. [ART score prognostic significance in patients with intermediate hepatocellular carcinoma]. *Cas Lek Cesk*, 2016. 155(1): p. 52-5.
100. Hsu, I.C., Metcalf, R.A., Sun, T., et al. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*, 1991. 350(6317): p. 427-8.
101. Huan, L., Bao, C., Chen, D., et al. MiR-127-5p targets the biliverdin reductase B/NF-kappaB pathway to suppress cell growth in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Sci*, 2015.
102. Huang, C., Sheng, S., Sun, X., et al. Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein decline after transcatheter arterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma predicts survival. *Clin Chim Acta*, 2014. 431: p. 232-8.
103. Hung, C.H., Hu, T.H., Lu, S.N., et al. Circulating microRNAs as biomarkers for diagnosis of early hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus. *Int J Cancer*, 2016. 138(3): p. 714-20.
104. Chan, I.S., Guy, C.D., Machado, M.V., et al. Alcohol activates the hedgehog pathway and induces related procarcinogenic processes in the alcohol-preferring rat model of hepatocarcinogenesis. *Alcohol Clin Exp Res*, 2014. 38(3): p. 787-800.
105. Chen, C.J., Wang, L.Y., Lu, S.N., et al. Elevated aflatoxin exposure and increased risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 1996. 24(1): p. 38-42.

106. Chen, F., Zhuang, X., Lin, L., et al. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med*, 2015. 13: p. 45.
107. Chen, Y.J., Yeh, S.H., Chen, J.T., et al. Chromosomal changes and clonality relationship between primary and recurrent hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2000. 119(2): p. 431-40.
108. Cheng, A.L., Kang, Y.K., Lin, D.Y., et al. Sunitinib versus sorafenib in advanced hepatocellular cancer: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol*, 2013. 31(32): p. 4067-75.
109. Chettouh, H., Lequoy, M., Fartoux, L., et al. Hyperinsulinaemia and insulin signalling in the pathogenesis and the clinical course of hepatocellular carcinoma. *Liver Int*, 2015. 35(10): p. 2203-17.
110. Chevaliez, S., Pawlotsky, J.M. HCV Genome and Life Cycle, in *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*, Tan, S.L., Editor. 2006: Norfolk (UK).
111. Choi, J., Corder, N.L., Koduru, B., Wang, Y. Oxidative stress and hepatic Nox proteins in chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Free Radic Biol Med*, 2014. 72: p. 267-84.
112. Cholankeril, G., Patel, R., Khurana, S., Satapathy, S.K. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis: Current knowledge and implications for management. *World J Hepatol*, 2017. 9(11): p. 533-543.
113. Chow, P.K.H., Gandhi, M., Tan, S.B., et al. SIRveNIB: Selective Internal Radiation Therapy Versus Sorafenib in Asia-Pacific Patients With Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Oncol*, 2018: p. JCO2017760892.
114. Chung, J.W., Park, J.H., Im, J.G., et al. Pulmonary oil embolism after transcatheter oily chemoembolization of hepatocellular carcinoma. *Radiology*, 1993. 187(3): p. 689-93.
115. Ikeda, K., Saitoh, S., Koida, I., et al. A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology*, 1993. 18(1): p. 47-53.
116. Inagaki, Y., Tang, W., Makuuchi, M., et al. Clinical and molecular insights into the hepatocellular carcinoma tumour marker des-gamma-carboxyprothrombin. *Liver Int*, 2011. 31(1): p. 22-35.
117. Janku, F., Kaseb, A.O., Tsimberidou, A.M., et al. Identification of novel therapeutic targets in the PI3K/AKT/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma using targeted next generation sequencing. *Oncotarget*, 2014. 5(10): p. 3012-22.

118. Jewell, J.,Sheron, N. Trends in European liver death rates: implications for alcohol policy. *Clin Med (Lond)*, 2010. 10(3): p. 259-63.
119. Johnson, P.J., Qin, S., Park, J.W., et al. Brivanib versus sorafenib as first-line therapy in patients with unresectable, advanced hepatocellular carcinoma: results from the randomized phase III BRISK-FL study. *J Clin Oncol*, 2013. 31(28): p. 3517-24.
120. Kensler, T.W.,Trush, M.A. Role of oxygen radicals in tumor promotion. *Environmental Mutagenesis*, 1984. 6(4): p. 593-616.
121. Kew, M.C. Hepatic iron overload and hepatocellular carcinoma. *Liver Cancer*, 2014. 3(1): p. 31-40.
122. Khalaf, N., Ying, J., Mittal, S., et al. Natural History of Untreated Hepatocellular Carcinoma in a US Cohort and the Role of Cancer Surveillance. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2017. 15(2): p. 273-281 e1.
123. Khansari, N., Shakiba, Y.,Mahmoudi, M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2009. 3(1): p. 73-80.
124. Kim, S.S., Seong, S., Lim, S.H.,Kim, S.Y. Biliverdin reductase plays a crucial role in hypoxia-induced chemoresistance in human glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. 440(4): p. 658-63.
125. Kim, S.Y., Kang, H.T., Choi, H.R.,Park, S.C. Biliverdin reductase A in the prevention of cellular senescence against oxidative stress. *Exp Mol.Med*, 2011. 43(1): p. 15-23.
126. Kokudo, N., Hasegawa, K., Akahane, M., et al. Evidence-based Clinical Practice Guidelines for Hepatocellular Carcinoma: The Japan Society of Hepatology 2013 update (3rd JSH-HCC Guidelines). *Hepatol Res*, 2015. 45(2).
127. Kong, G., Zhang, J., Zhang, S., et al. Upregulated microRNA-29a by hepatitis B virus X protein enhances hepatoma cell migration by targeting PTEN in cell culture model. *PLoS One*, 2011. 6(5): p. e19518.
128. Kudo, M. Proposal of Primary Endpoints for TACE Combination Trials with Systemic Therapy: Lessons Learned from 5 Negative Trials and the Positive TACTICS Trial. *Liver Cancer*, 2018. 7(3): p. 225-234.
129. Kudo, M., Finn, R.S., Qin, S., et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*, 2018. 391(10126): p. 1163-1173.
130. Kudo, M., Ueshima, K., Ikeda, M., et al. Randomized, open label, multicenter, phase II trial comparing transarterial chemoembolization (TACE) plus sorafenib with TACE

- alone in patients with hepatocellular carcinoma (HCC): TACTICS trial. 2018. 36(4_suppl): p. 206-206.
131. Kudo, Y., Tanaka, Y., Tateishi, K., et al. Altered composition of fatty acids exacerbates hepatotumorigenesis during activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Hepatol*, 2011. 55(6): p. 1400-8.
 132. Kuroi, K., Toi, M. Circulating angiogenesis regulators in cancer patients. *Int J Biol Markers*, 2001. 16(1): p. 5-26.
 133. Kwilas, A.R., Ardiani, A., Donahue, R.N., et al. Dual effects of a targeted small-molecule inhibitor (cabozantinib) on immune-mediated killing of tumor cells and immune tumor microenvironment permissiveness when combined with a cancer vaccine. *J Transl Med*, 2014. 12: p. 294.
 134. Kwon, H.J., Won, Y.S., Park, O., et al. Aldehyde dehydrogenase 2 deficiency ameliorates alcoholic fatty liver but worsens liver inflammation and fibrosis in mice. *Hepatology*, 2014. 60(1): p. 146-57.
 135. Lake, A.C., Sun, Y., Li, J.L., et al. Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members. *J Lipid Res*, 2005. 46(11): p. 2477-87.
 136. Lambeth, J.D. Nox/Duox family of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) oxidases. *Curr Opin Hematol*, 2002. 9(1): p. 11-7.
 137. Lane, D.P., Crawford, L.V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 1979. 278(5701): p. 261-3.
 138. Lanone, S., Bloc, S., Foresti, R., et al. Bilirubin decreases nos2 expression via inhibition of NAD(P)H oxidase: implications for protection against endotoxic shock in rats. *FASEB J*, 2005. 19(13): p. 1890-1892.
 139. Laso, F.J., Madruga, J.I., Giron, J.A., et al. Decreased natural killer cytotoxic activity in chronic alcoholism is associated with alcohol liver disease but not active ethanol consumption. *Hepatology*, 1997. 25(5): p. 1096-100.
 140. Lee, J.J., Loh, K., Yap, Y.S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. *Cancer Biol Med*, 2015. 12(4): p. 342-54.
 141. Lee, Y.S., Kang, Y.S., Lee, J.S., et al. Involvement of NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species in the apoptotic cell death by capsaicin in HepG2 human hepatoma cells. *Free Radic Res*, 2004. 38(4): p. 405-12.
 142. Lemon, S.M., McGivern, D.R. Is hepatitis C virus carcinogenic? *Gastroenterology*, 2012. 142(6): p. 1274-8.

143. Lerner-Marmarosh, N., Shen, J., Torno, M.D., et al. Human biliverdin reductase: a member of the insulin receptor substrate family with serine/threonine/tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(20): p. 7109-14.
144. Li, J., Kim, S.G., Blenis, J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab*, 2014. 19(3): p. 373-9.
145. Lieber, C.S. Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterology*, 1994. 106(4): p. 1085-105.
146. Linzer, D.I., Levine, A.J. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 1979. 17(1): p. 43-52.
147. Liu, L.J., Xie, S.X., Chen, Y.T., et al. Aberrant regulation of Wnt signaling in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2016. 22(33): p. 7486-99.
148. Liu, Y.L., Patman, G.L., Leathart, J.B., et al. Carriage of the PNPLA3 rs738409 C > G polymorphism confers an increased risk of non-alcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 2014. 61(1): p. 75-81.
149. Liu, Z., Jiang, Y., Yuan, H., et al. The trends in incidence of primary liver cancer caused by specific etiologies: Results from the Global Burden of Disease Study 2016 and implications for liver cancer prevention. *J Hepatol*, 2019. 70(4): p. 674-683.
150. Llovet, J.M. Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*, 2005. 40(3): p. 225-35.
151. Llovet, J.M., Bruix, J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology*, 2003. 37(2): p. 429-42.
152. Llovet, J.M., Di Bisceglie, A.M., Bruix, J., et al. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 2008. 100(10): p. 698-711.
153. Llovet, J.M., Moitinho, E., Sala, M., et al. Prevalence and prognostic value of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients presenting with spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol*, 2000. 33(3): p. 423-9.
154. Llovet, J.M., Real, M.I., Montana, X., et al. Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2002. 359(9319): p. 1734-9.
155. Llovet, J.M., Ricci, S., Mazzaferro, V., et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 2008. 359(4): p. 378-90.

156. Lo, C.M., Ngan, H., Tso, W.K., et al. Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2002. 35(5): p. 1164-71.
157. Ludwig, J., Viggiano, T.R., McGill, D.B., Oh, B.J. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*, 1980. 55(7): p. 434-8.
158. Maeda, S., Kamata, H., Luo, J.L., et al. IKK β couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell*, 2005. 121(7): p. 977-90.
159. Maghazal, G.J., Krause, K.H., Stocker, R., Jaquet, V. Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med*, 2012. 53(10): p. 1903-18.
160. Maines, M.D., Mayer, R.D., Erturk, E., et al. The oxidoreductase, biliverdin reductase, is induced in human renal carcinoma--pH and cofactor-specific increase in activity. *J Urol*, 1999. 162(4): p. 1467-1472.
161. Makuuchi, M., Kokudo, N., Arii, S., et al. Development of evidence-based clinical guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma in Japan. *Hepatol Res*, 2008. 38(1): p. 37-51.
162. Malagari, K. Drug-eluting particles in the treatment of HCC: chemoembolization with doxorubicin-loaded DC Bead. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2008. 8(10): p. 1643-50.
163. Mancebo, A., Gonzalez-Dieguez, M.L., Cadahia, V., et al. Annual incidence of hepatocellular carcinoma among patients with alcoholic cirrhosis and identification of risk groups. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2013. 11(1): p. 95-101.
164. Marcellin, P., Asselah, T., Boyer, N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology*, 2002. 36(5 Suppl 1): p. S47-56.
165. Margini, C., Dufour, J.F. The story of HCC in NAFLD: from epidemiology, across pathogenesis, to prevention and treatment. *Liver Int*, 2016. 36(3): p. 317-24.
166. Marrero, J.A., Su, G.L., Wei, W., et al. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in american patients. *Hepatology*, 2003. 37(5): p. 1114-21.
167. Marrogi, A.J., Khan, M.A., van Gijssel, H.E., et al. Oxidative Stress and p53 Mutations in the Carcinogenesis of Iron Overload-Associated Hepatocellular Carcinoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2001. 93(21): p. 1652-1655.

168. Matsui, J., Funahashi, Y., Uenaka, T., et al. Multi-kinase inhibitor E7080 suppresses lymph node and lung metastases of human mammary breast tumor MDA-MB-231 via inhibition of vascular endothelial growth factor-receptor (VEGF-R) 2 and VEGF-R3 kinase. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(17): p. 5459-65.
169. Matsui, O., Kobayashi, S., Sanada, J., et al. Hepatocellular nodules in liver cirrhosis: hemodynamic evaluation (angiography-assisted CT) with special reference to multi-step hepatocarcinogenesis. *Abdom Imaging*, 2011. 36(3): p. 264-72.
170. Mazzaferro, V., Regalia, E., Doci, R., et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med*, 1996. 334(11): p. 693-9.
171. Melle, C., Ernst, G., Scheibner, O., et al. Identification of specific protein markers in microdissected hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res*, 2007. 6(1): p. 306-315.
172. Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 1994. 17(3): p. 235-48.
173. Miralem, T., Hu, Z.B., Torno, M.D., et al. Small interference RNA-mediated gene silencing of human biliverdin reductase, but not that of heme oxygenase-1, attenuates arsenite-mediated induction of the oxygenase and increases apoptosis in 293A kidney cells. *J Biol Chem*, 2005. 280(17): p. 17084-17092.
174. Miura, K., Taura, K., Kodama, Y., et al. Hepatitis C virus-induced oxidative stress suppresses hepcidin expression through increased histone deacetylase activity. *Hepatology*, 2008. 48(5): p. 1420-9.
175. Morin, P.J. beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays*, 1999. 21(12): p. 1021-30.
176. Motterlini, R., Green, C.J., Foresti, R. Regulation of heme oxygenase-1 by redox signals involving nitric oxide. *Antioxid Redox Signal*, 2002. 4(4): p. 615-24.
177. Mukozu, T., Nagai, H., Matsui, D., et al. Serum VEGF as a tumor marker in patients with HCV-related liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*, 2013. 33(3): p. 1013-21.
178. Nahon, P., Zucman-Rossi, J. Single nucleotide polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *J Hepatol*, 2012. 57(3): p. 663-74.
179. Nakamura, S., Nouse, K., Sakaguchi, K., et al. Sensitivity and specificity of des-gamma-carboxy prothrombin for diagnosis of patients with hepatocellular carcinomas varies according to tumor size. *Am J Gastroenterol*, 2006. 101(9): p. 2038-43.

180. Nault, J.C., Calderaro, J., Di Tommaso, L., et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis. *Hepatology*, 2014. 60(6): p. 1983-92.
181. Nishimura, M., Takaki, A., Tamaki, N., et al. Serum oxidative-anti-oxidative stress balance is dysregulated in patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, 2013. 43(10): p. 1078-92.
182. O'Brien, L., Hosick, P.A., John, K., et al. Biliverdin reductase isozymes in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 2015. 26(4): p. 212-20.
183. Oliverius, M., Belina, F., Novotny, J., et al. [Treatment of hepatocellular carcinoma and current situation in the Czech Republic]. *Rozhl Chir*, 2007. 86(12): p. 635-41.
184. Osada, S., Kanematsu, M., Imai, H., Goshima, S. Clinical significance of serum HGF and c-Met expression in tumor tissue for evaluation of properties and treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 2008. 55(82-83): p. 544-9.
185. Ott, P.A., Hodi, F.S., Buchbinder, E.I. Inhibition of Immune Checkpoints and Vascular Endothelial Growth Factor as Combination Therapy for Metastatic Melanoma: An Overview of Rationale, Preclinical Evidence, and Initial Clinical Data. *Front Oncol*, 2015. 5: p. 202.
186. Pal, S., Polyak, S.J., Bano, N., et al. Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010. 25(3): p. 627-34.
187. Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F.M., Petrosillo, G. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 2014. 20(39): p. 14205-18.
188. Park, S.J., Jang, J.Y., Jeong, S.W., et al. Usefulness of AFP, AFP-L3, and PIVKA-II, and their combinations in diagnosing hepatocellular carcinoma. *Medicine (Baltimore)*, 2017. 96(11): p. e5811.
189. Parker, G.A., Picut, C.A. Liver immunobiology. *Toxicol Pathol*, 2005. 33(1): p. 52-62.
190. Perz, J.F., Armstrong, G.L., Farrington, L.A., et al. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*, 2006. 45(4): p. 529-38.
191. Petersen, D.R. Alcohol, iron-associated oxidative stress, and cancer. *Alcohol*, 2005. 35(3): p. 243-9.

192. Piscaglia, F., Svegliati-Baroni, G., Barchetti, A., et al. Clinical patterns of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver disease: A multicenter prospective study. *Hepatology*, 2016. 63(3): p. 827-38.
193. Pollicino, T., Squadrito, G., Cerenzia, G., et al. Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection. *Gastroenterology*, 2004. 126(1): p. 102-10.
194. Protzer, U., Maini, M.K., Knolle, P.A. Living in the liver: hepatic infections. *Nat Rev Immunol*, 2012. 12(3): p. 201-13.
195. Quail, D.F., Joyce, J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*, 2013. 19(11): p. 1423-37.
196. Quinn, M.T., Gauss, K.A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol*, 2004. 76(4): p. 760-81.
197. Raimondo, G., Allain, J.P., Brunetto, M.R., et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 2008. 49(4): p. 652-7.
198. Ramadori, P., Cubero, F.J., Liedtke, C., et al. Alcohol and Hepatocellular Carcinoma: Adding Fuel to the Flame. *Cancers (Basel)*, 2017. 9(10).
199. Raoul, J.L., Kudo, M., Finn, R.S., et al. Systemic therapy for intermediate and advanced hepatocellular carcinoma: Sorafenib and beyond. *Cancer Treat Rev*, 2018. 68: p. 16-24.
200. Ratzliff, V., Bellentani, S., Cortez-Pinto, H., et al. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol*, 2010. 53(2): p. 372-84.
201. Rebouissou, S., Nault, J.C. Advances in molecular classification and precision oncology in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 2020. 72(2): p. 215-229.
202. Rehermann, B., Nascimbeni, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(3): p. 215-29.
203. Ribas, A. Adaptive Immune Resistance: How Cancer Protects from Immune Attack. *Cancer Discov*, 2015. 5(9): p. 915-9.
204. Rockey, D.C., Caldwell, S.H., Goodman, Z.D., et al. Liver biopsy. *Hepatology*, 2009. 49(3): p. 1017-44.
205. Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*, 2008. 40(12): p. 1461-5.

206. Salem, R., Gordon, A.C., Mouli, S., et al. Y90 Radioembolization Significantly Prolongs Time to Progression Compared With Chemoembolization in Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, 2016. 151(6): p. 1155-1163 e2.
207. Salven, P., Lymboussaki, A., Heikkila, P., et al. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol*, 1998. 153(1): p. 103-8.
208. Sasaki, Y. Does oxidative stress participate in the development of hepatocellular carcinoma? *Journal of Gastroenterology*, 2006. 41(12): p. 1135-1148.
209. Seki, E., Brenner, D.A. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology*, 2008. 48(1): p. 322-35.
210. Senturk, H., Cumali, R. Extreme elevation of serum alpha fetoprotein in decompensated cirrhosis without HCC: an ominous sign. *Int J Biol Markers*, 2007. 22(1): p. 19-23.
211. Shao, C., Deng, L., Henegariu, O., et al. Chromosome instability contributes to loss of heterozygosity in mice lacking p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(13): p. 7405-10.
212. Shawky El Sawabi, A., Abdel Wahab, K., Ibrahim, W., et al. α -Fetoprotein (AFP)-L3% and transforming growth factor B1 (TGFB1) in prognosis of hepatocellular carcinoma after radiofrequency. *Egyptian Liver Journal*, 2019. 9(1): p. 8.
213. Sherman, M. Hepatocellular Carcinoma: Pay Now or Pay More Later. *Ann Hepatol*, 2017. 16(4): p. 478-479.
214. Sherman, M. Risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B and prevention through treatment. *Cleve Clin J Med*, 2009. 76 Suppl 3: p. S6-9.
215. Sherman, M. Serological surveillance for hepatocellular carcinoma: time to quit. *J Hepatol*, 2010. 52(4): p. 614-5.
216. Sherr, C.J., Roberts, J.M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, 1999. 13(12): p. 1501-12.
217. Sheu, J.C., Sung, J.L., Chen, D.S., et al. Growth rate of asymptomatic hepatocellular carcinoma and its clinical implications. *Gastroenterology*, 1985. 89(2): p. 259-66.
218. Shrivastava, S., Steele, R., Ray, R., Ray, R.B. MicroRNAs: Role in Hepatitis C Virus pathogenesis. *Genes Dis*, 2015. 2(1): p. 35-45.
219. Schulz, S., Wong, R.J., Vreman, H.J., Stevenson, D.K. Metalloporphyrins - an update. *Front Pharmacol*, 2012. 3: p. 68.
220. Schuppan, D., Schattenberg, J.M. Non-alcoholic steatohepatitis: pathogenesis and novel therapeutic approaches. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013. 28 Suppl 1: p. 68-76.

221. Sidharthan, S., Kottilil, S. Mechanisms of alcohol-induced hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int*, 2014. 8(2): p. 452-7.
222. Sieghart, W., Huckle, F., Pinter, M., et al. The ART of decision making: retreatment with transarterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2013. 57(6): p. 2261-73.
223. Silva, M.A., Hegab, B., Hyde, C., et al. Needle track seeding following biopsy of liver lesions in the diagnosis of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gut*, 2008. 57(11): p. 1592-6.
224. Singal, A., Volk, M.L., Waljee, A., et al. Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*, 2009. 30(1): p. 37-47.
225. Smith, R.A., Tang, J., Tudur-Smith, C., et al. Meta-analysis of immunohistochemical prognostic markers in resected pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 2011. 104(9): p. 1440-51.
226. Song, S.Y., Chung, J.W., Han, J.K., et al. Liver abscess after transcatheter oily chemoembolization for hepatic tumors: incidence, predisposing factors, and clinical outcome. *J Vasc Interv Radiol*, 2001. 12(3): p. 313-20.
227. Stenflo, J., Fernlund, P., Egan, W., Roepstorff, P. Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1974. 71(7): p. 2730-3.
228. Subhanova, I., Muchova, L., Lenicek, M., et al. Expression of Biliverdin Reductase A in peripheral blood leukocytes is associated with treatment response in HCV-infected patients. *PLoS One*, 2013. 8(3): p. e57555.
229. Summers, J., Smith, P.M., Horwich, A.L. Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J Virol*, 1990. 64(6): p. 2819-24.
230. Sun, W., Xu, F., Li, X., Li, C.R. A Case Series of Liver Abscess Formation after Transcatheter Arterial Chemoembolization for Hepatic Tumors. *Chin Med J (Engl)*, 2017. 130(11): p. 1314-1319.
231. Sung, W.K., Zheng, H., Li, S., et al. Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, 2012. 44(7): p. 765-9.
232. Tabrizian, P., Jibara, G., Shrager, B., et al. Recurrence of hepatocellular cancer after resection: patterns, treatments, and prognosis. *Ann Surg*, 2015. 261(5): p. 947-55.
233. Tahmasebi Birgani, M., Carloni, V. Tumor Microenvironment, a Paradigm in Hepatocellular Carcinoma Progression and Therapy. *Int J Mol Sci*, 2017. 18(2).

234. Takaki, A., Yamamoto, K. Control of oxidative stress in hepatocellular carcinoma: Helpful or harmful? *World J Hepatol*, 2015. 7(7): p. 968-79.
235. Takeuchi, Y., Ikeda, F., Moritou, Y., et al. The impact of patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 polymorphism on hepatocellular carcinoma prognosis. *J Gastroenterol*, 2013. 48(3): p. 405-12.
236. Tanaka, S., Mogushi, K., Yasen, M., et al. Oxidative stress pathways in noncancerous human liver tissue to predict hepatocellular carcinoma recurrence: A prospective, multicenter study. *Hepatology*, 2011. 54(4): p. 1273-1281.
237. Tornillo, L., Carafa, V., Sauter, G., et al. Chromosomal alterations in hepatocellular nodules by comparative genomic hybridization: high-grade dysplastic nodules represent early stages of hepatocellular carcinoma. *Lab Invest*, 2002. 82(5): p. 547-53.
238. Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2015. 65(2): p. 87-108.
239. Torrecilla, S., Sia, D., Harrington, A.N., et al. Trunk mutational events present minimal intra- and inter-tumoral heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 2017. 67(6): p. 1222-1231.
240. Trepo, E., Nahon, P., Bontempi, G., et al. Association between the PNPLA3 (rs738409 C>G) variant and hepatocellular carcinoma: Evidence from a meta-analysis of individual participant data. *Hepatology*, 2014. 59(6): p. 2170-7.
241. Trevisani, F., D'Intino, P.E., Morselli-Labate, A.M., et al. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. *J Hepatol*, 2001. 34(4): p. 570-5.
242. Trichopoulos, D., Bamia, C., Lagiou, P., et al. Hepatocellular carcinoma risk factors and disease burden in a European cohort: a nested case-control study. *J Natl Cancer Inst*, 2011. 103(22): p. 1686-95.
243. Trinchet, J.C., Chaffaut, C., Bourcier, V., et al. Ultrasonographic surveillance of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a randomized trial comparing 3- and 6-month periodicities. *Hepatology*, 2011. 54(6): p. 1987-97.
244. Tsukiyama-Kohara, K. Role of oxidative stress in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis C virus. *Int J Mol Sci*, 2012. 13(11): p. 15271-8.
245. Tu, Z., Pierce, R.H., Kurtis, J., et al. Hepatitis C virus core protein subverts the antiviral activities of human Kupffer cells. *Gastroenterology*, 2010. 138(1): p. 305-14.
246. Tuma, D.J., Casey, C.A. Dangerous byproducts of alcohol breakdown--focus on adducts. *Alcohol Res Health*, 2003. 27(4): p. 285-90.

247. Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni, P., Mahajan, R.T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuroparmacol*, 2009. 7(1): p. 65-74.
248. Valenti, L., Dongiovanni, P., Ginanni Corradini, S., et al. PNPLA3 I148M variant and hepatocellular carcinoma: a common genetic variant for a rare disease. *Dig Liver Dis*, 2013. 45(8): p. 619-24.
249. Valenti, L., Motta, B.M., Soardo, G., et al. PNPLA3 I148M polymorphism, clinical presentation, and survival in patients with hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 2013. 8(10): p. e75982.
250. van der Meer, A.J., Feld, J.J., Hofer, H., et al. Risk of cirrhosis-related complications in patients with advanced fibrosis following hepatitis C virus eradication. *J Hepatol*, 2017. 66(3): p. 485-493.
251. van Haaften, R.I., Haenen, G.R., Evelo, C.T., Bast, A. Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes. *Drug Metab Rev*, 2003. 35(2-3): p. 215-53.
252. van Meer, S., de Man, R.A., van den Berg, A.P., et al. No increased risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis due to Wilson disease during long-term follow-up. *J Gastroenterol Hepatol*, 2015. 30(3): p. 535-9.
253. Vilana, R., Forner, A., Bianchi, L., et al. Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma in cirrhosis patients may display a vascular pattern similar to hepatocellular carcinoma on contrast-enhanced ultrasound. *Hepatology*, 2010. 51(6): p. 2020-9.
254. Vilgrain, V., Pereira, H., Assenat, E., et al. Efficacy and safety of selective internal radiotherapy with yttrium-90 resin microspheres compared with sorafenib in locally advanced and inoperable hepatocellular carcinoma (SARAH): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2017. 18(12): p. 1624-1636.
255. Villanueva, A. Hepatocellular Carcinoma. Reply. *N Engl J Med*, 2019. 381(1): p. e2.
256. Vitek, L., Ostrow, J.D. Bilirubin chemistry and metabolism; harmful and protective aspects. *Curr Pharm Des*, 2009. 15(25): p. 2869-83.
257. Vitek, L., Schwertner, H.A. The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Adv Clin Chem*, 2007. 43: p. 1-57.
258. Vogel, A., Cervantes, A., Chau, I., et al. Hepatocellular carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 2018. 29(Supplement_4): p. iv238-iv255.
259. Vollmar, B., Menger, M.D. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev*, 2009. 89(4): p. 1269-339.

260. Wang, K. Molecular mechanisms of hepatic apoptosis. *Cell Death Dis*, 2014. 5: p. e996.
261. Was, H., Dulak, J., Jozkowicz, A. Heme oxygenase-1 in tumor biology and therapy. *Curr Drug Targets*, 2010. 11(12): p. 1551-70.
262. Wegiel, B., Baty, C.J., Gallo, D., et al. Cell surface biliverdin reductase mediates biliverdin-induced anti-inflammatory effects via phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. *J Biol Chem*, 2009. 284(32): p. 21369-78.
263. White, D.L., Kanwal, F., El-Serag, H.B. Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2012. 10(12): p. 1342-1359 e2.
264. White, D.L., Thrift, A.P., Kanwal, F., et al. Incidence of Hepatocellular Carcinoma in All 50 United States, From 2000 Through 2012. *Gastroenterology*, 2017. 152(4): p. 812-820 e5.
265. Wilfred de Alwis, N.M., Day, C.P. Genetics of alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*, 2007. 27(1): p. 44-54.
266. Willis, D., Tomlinson, A., Frederick, R., et al. Modulation of heme oxygenase activity in rat brain and spleen by inhibitors and donors of nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. 214(3): p. 1152-6.
267. Xidakis, C., Ljumovic, D., Manousou, P., et al. Production of pro- and anti-fibrotic agents by rat Kupffer cells; the effect of octreotide. *Dig Dis Sci*, 2005. 50(5): p. 935-41.
268. Xu, C., Yan, Z., Zhou, L., Wang, Y. A comparison of glypican-3 with alpha-fetoprotein as a serum marker for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013. 139(8): p. 1417-24.
269. Xu, R.H., Wei, W., Krawczyk, M., et al. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Nat Mater*, 2017. 16(11): p. 1155-1161.
270. Xu, Z., Chen, L., Leung, L., et al. Liver-specific inactivation of the Nrfl gene in adult mouse leads to nonalcoholic steatohepatitis and hepatic neoplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. 102(11): p. 4120-4125.
271. Yamaguchi, R., Yano, H., Iemura, A., et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 1998. 28(1): p. 68-77.
272. Yang, J.D., Nakamura, I., Roberts, L.R. The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: current status and therapeutic targets. *Semin Cancer Biol*, 2011. 21(1): p. 35-43.

273. Yang, S., Liu, G. Targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*, 2017. 13(3): p. 1041-1047.
274. Yoon, D.Y., Park, J.H., Chung, J.W., et al. Iatrogenic dissection of the celiac artery and its branches during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma: outcome in 40 patients. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 1995. 18(1): p. 16-9.
275. Yoshida, T., Hanada, T., Tokuhisa, T., et al. Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *J Exp Med*, 2002. 196(5): p. 641-53.
276. Younossi, Z.M., Otgonsuren, M., Henry, L., et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) with hepatocellular carcinoma (HCC) in the United States from 2004 to 2009. *Hepatology*, 2015. 62(6): p. 1723-30.
277. Yuan, K., Lian, Z., Sun, B., et al. Role of miR-148a in hepatitis B associated hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 2012. 7(4): p. e35331.
278. Zhang, B., Yang, B. Combined alpha fetoprotein testing and ultrasonography as a screening test for primary liver cancer. *J Med Screen*, 1999. 6(2): p. 108-10.
279. Zhang, B.H., Yang, B.H., Tang, Z.Y. Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004. 130(7): p. 417-22.
280. Zhang, C., Huys, A., Thibault, P.A., Wilson, J.A. Requirements for human Dicer and TRBP in microRNA-122 regulation of HCV translation and RNA abundance. *Virology*, 2012. 433(2): p. 479-88.
281. Zhang, T., Liu, Y., Yang, T., et al. Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiol Biochem*, 2006. 44(5-6): p. 274-83.
282. Zhou, F., Shang, W., Yu, X., Tian, J. Glypican-3: A promising biomarker for hepatocellular carcinoma diagnosis and treatment. *Med Res Rev*, 2018. 38(2): p. 741-767.
283. Zhu, A.X., Rosmorduc, O., Evans, T.R., et al. SEARCH: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of sorafenib plus erlotinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*, 2015. 33(6): p. 559-66.

8 PŘÍLOHY

8.1 Příloha 1

Kubickova K, Subhanova I, Konickova R, Matousova L, Parobkova H, Kupec M, Pudil J, Urbanek P, Vitek L: Predictive role BLVRA mRNA expression in hepatocellular cancer. Annals of Hepatology 2016; 15(6): 881-887. **IF 1,68**



Predictive role *BLVRA* mRNA expression in hepatocellular cancer

Kristýna Kubíčková,* Iva Subhanová,† Renáta Koníčková,†
Linda Matoušová,† Petr Urbánek,* Hana Parobková,‡ Martin Kupec,§ Jiří Pudil,|| Libor Vitek†,†

* Department of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, and Military University Hospital, Prague, Czech Republic.

† Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, General University Hospital, and 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic.

‡ Department of Radiology, Military University Hospital, Prague, Czech Republic.

§ Department of Oncology, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, and Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic, Prague, Czech Republic.

|| Department of Surgery, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, and Military University Hospital, Prague, Czech Republic.

† 4th Department of Internal Medicine, General University Hospital, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic.

ABSTRACT

Introduction and aim. Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary malignant liver tumor. It is primarily caused by hepatic cirrhosis or chronic viral hepatitis. Hepatic carcinogenesis is associated with increased oxidative stress. Thus, the aim of our study was to assess expression of the genes involved in the homeostasis of oxidative stress in patients with HCC. **Material and methods.** The study was performed on 32 patients with primary HCC (verified by liver histology in 29 patients) and 27 control subjects (in 11 subjects, liver histology was available either with no or minimal changes in the liver tissue). Gene expressions of heme oxygenase 1 (*HMOX1*), biliverdin reductase A/B (*BLVRA/B*), NADPH oxidase 2 (*NOX2*) and *p22^{phox}* were analyzed in the liver and peripheral blood leukocytes (PBL) in the subjects. **Results.** Compared to controls, almost a 3 times higher mRNA level of *BLVRA* was detected in livers of HCC patients ($p = 0.002$); while those of *BLVRB* as well as *HMOX1* were unchanged ($p > 0.05$). In accord with these results in the liver tissue, *BLVRA* mRNA levels in PBL were also significantly increased in HCC patients ($p = 0.012$). mRNA levels of *NOX2* and *p22^{phox}* in the liver tissue, although higher in HCC patients, did not differ significantly compared to control subjects ($p > 0.05$). Nevertheless, *NOX2* mRNA level in PBL was significantly higher in HCC patients ($p = 0.003$). **Conclusions.** *BLVRA* mRNA levels in the liver as well as in PBL are significantly higher in HCC patients most likely as a feedback mechanism to control increased oxidative stress associated with HCC progression.

Key words. Biliverdin reductase. Heme catabolic pathway. Heme oxygenase. Liver cirrhosis. Oxidative stress.

INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary malignant liver tumor. The global mortality rate is 694,000 cases per year.¹ Worldwide, HCC is the fifth most common cancer in men and the seventh in women; representing the third most frequent cause of cancer-related death.² The incidence of HCC has different geographical distributions; sub-Saharan Africa, China, Hong Kong and Taiwan being among those regions with the highest incidence rates of HCC (i.e., more than 15 cases per 100,000 population per year).³ Conversely, North and South Amer-

ica and most of Europe are among those countries with a lower incidence. However, in recent years, the incidence rates have increased even in these regions, and this trend is expected to continue.⁴

This malignant disease arises in patients with chronic liver disease, mostly at the stage of liver cirrhosis. Almost 90 percent of cases are due to underlying cirrhosis or chronic hepatitis B and C virus infections.⁵ Well-defined etiological agents for the development of HCC are aflatoxin and excessive alcohol intake. Also, non-alcoholic steatohepatitis due to obesity, metabolic syndrome, and diabetes contribute significantly to the incidence of HCC.⁶

Manuscript received: March 22, 2016.

Manuscript accepted: April 13, 2016.

DOI:10.5604/16652681.1222104.

As far as the risk factors are known, screening programs for the risk groups can be established with an aim to detect tumors in the early stages. However, according to the available data, only 30% of patients with HCC are diagnosed in the early stages, when curative treatment is still possible.⁷ The recommended method of surveillance of HCC is a liver ultrasound at 6-month intervals,⁸ having sensitivity of about 65-80%, and a specificity of almost 90%.⁹

A combination of liver ultrasound and serum α 1-fetoprotein (AFP) had been recommended in the previous guidelines. However, even combinations of these procedures is not sufficiently sensitive or specific to be used as a surveillance assay. AFP is typically increased in advanced tumors,¹⁰ but can be elevated in cholangiocarcinoma, liver metastases of colorectal cancer, gastric, testicular, or ovarian cancer; and it is also raised in cirrhosis. At the time of diagnosis, over 30% of HCC patients have normal serum levels of AFP.¹¹ According to current AASLD guidelines, AFP serology is still considered an inadequate screening test for HCC.

Thus, new biomarkers are needed for early diagnosis of HCC. In fact, several of them are now under investigation including oxidative stress markers, angiogenic growth factors, or other markers such as glypican-3,¹² lectin-bound AFP or des- γ carboxyprotrombin.¹³ However, so far, none of these, has been adequately investigated to be recommended as a screening test.

Hepatic carcinogenesis is a complex, multi-step process involving all pro-oncogenic and protective mechanisms. Increased production of reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RONS) is considered to be a trigger point in hepatic carcinogenesis.

NADPH oxidase (NOX) is a multiprotein enzyme complex importantly involved in ROS production,¹⁴ a phenomenon believed to contribute significantly to the apoptosis of liver cells.¹⁵ NOX2, NADPH oxidase prototypic isoform is activated by the p22^{phox} protein, which stabilizes and binds it to other subunits.¹⁶

The important enzyme in the antioxidant defense is heme oxygenase (*HMOX*), having two isoforms - *HMOX1*, highly inducible by oxidative stress, and *HMOX2*, the constitutive isoenzyme.¹⁷ *HMOX* catalyzes the degradation of heme to biliverdin, carbon monoxide, and iron. Although controversies exist on the role of *HMOX1* in carcinogenesis,¹⁸ both biliverdin and carbon monoxide exert important protective effects against oxidative stress.¹⁷

Another key enzyme in the heme catabolic pathway is biliverdin reductase (*BLVR*), reducing biliverdin to bilirubin, believed to be the most potent endogenous antioxidant substance.¹⁹ *BLVR* exists in two isoforms - *BLVR4*, the major enzyme in adults, and *BLVRB*, the

predominant isoform in the fetus.²⁰ *BLVR4* has multiple additional functions also acting as a transcription factor,²¹ a unique serine/threonine/tyrosine kinase,²² as well as cell membrane receptor involved in the immune response.²³ Its role in carcinogenesis still remains to be elucidated.²⁴

The aim of our study was to assess the expressions of those genes involved in the homeostasis of oxidative stress in patients with HCC.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

The study was performed on 32 patients with primary HCC (verified by liver histology in 29 patients) and 38 control subjects. The HCC patients were diagnosed, followed, and treated in the Military University Hospital in Prague between 2011 - 2014. Diagnosis of HCC was made by clinical, laboratory, and imaging (CT, MRI) examination. Liver histology was available from 29 patients (23 from CT-guided biopsies, in the remaining 6 patients the material was obtained from surgically-resected tissue).

Blood samples were analyzed in 32 patients with HCC - those with a verified diagnosis by histological examination; plus those with a likely diagnosis of HCC without histological verification, but diagnosed radiologically (typical imaging features were present in a contrast-enhanced study via dynamic CT-scan or MRI). A liver biopsy was not performed in these patients due to disapproval of the patient, advanced stage of the disease or contraindication of a liver biopsy.

As controls, 27 healthy volunteers (blood donors or employees of General Faculty Hospital and 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague) were used for gene expression studies in PBL. Eleven subjects who underwent a liver biopsy which resulted in no or minimal changes in the liver tissue (5 with non-alcoholic fatty liver disease, 3 with minimal changes, and 3 with normal liver histology) were used as controls for gene expression studies in liver tissue.

The study was registered under ID: NCT00842205 (www.clinicaltrials.gov). The study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. All subjects involved in the study had provided prior written informed consent.

Material sampling and storage

Liver samples obtained from routinely performed CT-guided biopsies, or by liver tissue excision during surgical procedure were immediately placed into a RNAlater (Ambion Diagnostics, Austin, TX, USA) and stored at -80°C. Blood samples for gene expression analyses were

collected into PAXgene Blood RNA Tubes (PreAnalytix, Hombrechtikon, Switzerland) and stored at -80°C until total RNA isolation.

Total RNA isolation and reverse transcription

Homogenization of liver tissue and isolation of total RNA was performed using RNeasy Mini (Qiagen, Dallas, TX, USA), isolation total RNA from PBL using a PAXgene kit (Qiagen, Dallas, TX, USA), according to the manufacturer's instructions. DNase treatment with RNase-free DNase (Qiagen, Dallas, TX, USA); prior to cDNA synthesis was carried out according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized from 0.2 µg of total RNA in a final volume of 20 µg using a High-Capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Gene expression quantification

The *BLVRA*, *BLVRB*, *HMOX1* and hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT) primer sequences were used as described previously.²⁵ Primers for *NOX2* and *p22^{phox}* were designed using Primer 3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>, accessed 2013 Feb 01) and synthesized by Genetech Biotech (Hradec Králové, Czech Republic) (Table 1).

To determine the relative gene expression level of all data analysis, HPRT mRNA expressions were measured as internal controls. The fold change was calculated as $2^{-\Delta\Delta C_t}$. The qPCR was performed in a 20 µL reaction volume, containing 4 µL of five-fold diluted cDNA template from a completed RT reaction, 1x SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and 200 nM (400 nM for *BLVRB*, 1000 nM for *p22^{phox}*) of forward and reverse primers. All RT-PCR were set up in 96-well optical plates, and run on an ABI PRISM 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

The cycling conditions included polymerase activation at 95°C for 10 min, followed with 40 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 60 s. PCR products were subjected to a melting curve analysis. All samples were analyzed in triplicates. PCR efficiencies for target and housekeeping cDNA were 96 -105%.

Serum biochemistry

Serum markers of liver injury (ALT, AST, GGT, ALP) and bilirubin were analyzed by routine assays on an automated analyzer (Cobas R8000 Modular analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Hematologic parameters were also analyzed on automated analyzers - INR on ACL500 (Instrumentation Laboratory, Bedford, Laboratory, Bedford, Massachusetts, USA); hemoglobin and platelets on a Sysmex XE-5000 a XT-2000i (Sysmex Corporation, Kobe, Japan), respectively.

Statistical analysis

Due to the non-normal distribution, data are described as median and IQ range. Differences between the studied groups were evaluated using the Mann-Whitney rank sum test. All analyses were performed with alpha set to 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

The basic clinical and laboratory characteristics of our HCC patients are shown in table 2. The median age of our HCC patients was 69 years, HCC was almost 4 times more frequent in men than in women. The most prevalent underlying cause of HCC was non-alcoholic steatohepatitis (NASH), followed with alcoholic liver disease (ALD) (Table 3).

Hepatic carcinogenesis is a complex process, the understanding of which is still far from complete. Nevertheless, the role of increased oxidative stress and a dysfunctional antioxidant defense system seems to contribute significantly to the manifestation and progression

Table 1. Primer sequences for target and internal control genes.

Genes	Forward primer	Reverse primer	Fragment (bp)
<i>HMOX1</i>	GGGTGATAGAAGAGGCCAAGA	TTTGAGGAGTTGCAGGAGCT	67
<i>BLVRA</i>	TCCCTCTTTGGGAGCTTTC	GGACCCAGACTTGAAATGGAAG	180
<i>BLVRB</i>	CCACGTGGTAGTGGGAGATG	TCGTGGGACTGAGGTCATTG	110
<i>p22^{phox}</i>	CTTACCCAGTGGTACTTTGG	GGCGGTCATGTACTTCTGTCC	130
<i>NOX2</i>	GATTCTCTTGCCAGTCTGTCG	ATTCTGTCCAGTTGTCTTCG	94
<i>HPRT</i>	CACTGGCAAAACAATGCAGAC	GGGTCTTTTCACCAGCAAG	96

HMOX1: heme oxygenase 1. *BLVRA*: biliverdin reductase A. *BLVRB*: biliverdin reductase B. *NOX2*: NADPH oxidase 2. *HPRT*: hypoxanthine phosphoribosyl transferase.

Table 2. Clinical and laboratory characteristics of HCC patients.

Gender (M:F ratio)	3.83
Age (years)	69 (61.0 - 74.0)
Total bilirubin (μmol/l)	15.3 (10.8 - 22.1)
ALT (μkat/l)	0.53 (0.4 - 0.8)
AST (μkat/l)	1.14 (0.8 - 1.6)
GGT (μkat/l)	2.9 (1.2 - 6.2)
ALP (μkat/l)	2.3 (1.7 - 4.4)
Albumin (g/l)	33.9 ± 4.6
INR	1.22 (1.1 - 1.32)
Hemoglobin (g/l)	121.1 ± 19.1
Platelets (x 10 ⁹ /l)	203.5 ± 94.1

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; GGT, gamma glutamyl transpeptidase; INR, international normalized ratio of prothrombin time. Data expressed as mean ± standard deviation, or median (IQ range) depending on data normality.

of HCC (reviewed in reference 26). For instance, mice deficient in CuZn superoxide dismutase, which converts superoxide to H₂O₂, exhibit increased incidence of HCC.²⁷ Increased oxidative stress induced by hepatitis C virus infection, resulting in increased hepatic tumorigenesis, was also reported.²⁸ The role of NOX, the major producer of superoxide in the mitochondria in mediating transforming growth factor (TGF)-β-induced hepatic fibrosis and carcinogenesis is also well recognized.²⁹ In this context, it is interesting to note that bilirubin, one of the most important endogenous antioxidant substances,³⁰ is a potent inhibitor of NOX.^{31,32}

For decades the heme catabolic pathway has only been recognized only as a pathway required for the disposal of heme degradation products, but is now believed to play an important role in protection from increased oxidative stress.¹⁹ This pathway includes two important enzymes, HMOX and BLVR, reducing biliverdin to bilirubin, the major endogenous antioxidant. *HMOX1*, an inducible isoform, is a matter of controversy in terms of its role in carcinogenesis.¹⁸ While in some cancers *HMOX1* gene expression may be viewed as a negative prognostic factor,³³ clinical studies show that subjects with a more active *HMOX1* gene variant are less likely to develop a variety of tumors (for review see reference 34). The protective role of *HMOX1* was also reported in an animal model of hepatic carcinogenesis, demonstrating increased malignancy when *HMOX1* was downregulated.³⁵ However, in our study, we were not able to identify *HMOX1* mRNA expression to be differentially modulated in HCC patients, either in the tumor tissue (0.67 ± 0.73 vs. 0.55 ± 0.38 , $p > 0.05$) (Figure 1) or in PBL (1.91 ± 2.1 vs. 1.51 ± 0.62 , $p > 0.05$). Nevertheless, *BLVR4* mRNA level was significantly upregulated in our HCC patients, both in tumor tissue and PBL. In fact, an almost 3 times higher mRNA levels of *BLVR4* were detected in livers of HCC patients com-

Table 3. Etiology of the HCC.

Etiology	Patients (n)
NASH	10
ALD	7
HCV	5
NASH+ALD	3
HBV	2
Fibrosis (unknown cause)	1
Hemochromatosis	1

NASH: non-alcoholic steatohepatitis. ALD: alcoholic liver disease. HCV: viral hepatitis C. HBV: viral hepatitis B.

pared to controls (1.14 ± 0.76 vs. 0.41 ± 0.24 , $p = 0.002$). In accord with results in the liver tissue, *BLVR4* mRNA level in PBL was also significantly increased in our HCC patients (1.17 ± 0.46 vs. 0.90 ± 0.29 , $p = 0.012$).

These results are in accord with recent data by De Giorgi, *et al.* on patients with HCV-induced HCC³⁶ as well as our own results demonstrating increased *BLVR4* mRNA expression in HCV infected patients.²⁵ Our data are also corroborated by the immunohistological study by Arena, *et al.*, who showed increased protein expression of BLVR in tumor tissues of patients with melanoma.³⁷ Overexpression of a *BLVR4* protein was also reported in clinical renal cancers,³⁸ as well as vaginal carcinomas.³⁹ *BLVRB*, the other BLVR isoenzyme being predominantly important during fetal life, was reported to be upregulated on a protein level in HCC patients by Melle, *et al.*,⁴⁰ and its possible pro-carcinogenic role in HCC was also described in a recent experimental study by Huan, *et al.*⁴¹ However, we were not able to confirm this data, since only a mild and non-significant elevation of *BLVRB* mRNA levels was found in our HCC patients compared to controls (0.73 ± 0.97 vs. 0.61 ± 0.26 , $p > 0.05$) (Figure 1).

The functional significance of increased *BLVR4* mRNA expression remains to be answered. One explanation might be feedback stimulation of the antioxidant defense, which is what we believe is true in HCV-infected patients; those who responded to antiviral therapy had much higher *BLVR4* mRNA expression compared to non-responders.²⁵ The beneficial role of *BLVR4* in preventing oxidative stress-induced senescence was also reported,⁴² supporting this hypothesis. On the other hand, *BLVR4* silencing in renal cells had a pro-apoptotic effect,⁴³ and *BLVR4*, surprisingly serving as a transcription factor, is a known activator of multiple pro-proliferative intracellular signaling pathways.²⁴ *BLVR4* is also a sensor of intracellular hypoxia; indeed, its expression has been shown to be significantly increased in response to hypoxia.⁴⁴ Thus, it seems that several mechanisms are behind the up-regulated *BLVR4* observed in biological studies.

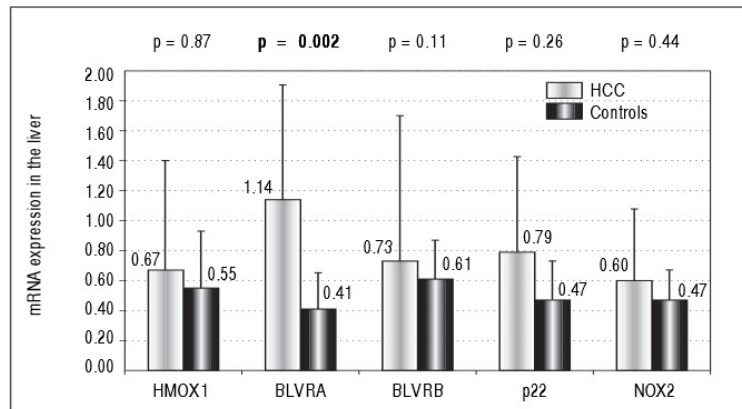


Figure 1. mRNA levels of selected genes in the liver of HCC patients. HMOX1: heme oxygenase 1. BLVRA: biliverdin reductase A. BLVRB: biliverdin reductase B. p22: gene encoding for p22^{phox} protein. NOX2: NADPH oxidase 2.

Our explanation of increased *BLVRA* mRNA expression due to increased oxidative stress might be plausible, as evidenced by increased *NOX2* mRNA levels in the PBL of our HCC patients. Although mRNA levels of *NOX2* and *p22^{phox}* in the liver tissue only showed a non-significantly higher trend in our HCC patients (0.60 ± 0.47 , and 0.79 ± 0.64 vs. 0.47 ± 0.26 , respectively, $p > 0.05$ for both comparisons) (Figure 1), mRNA level of *NOX2* in PBL was significantly higher in these HCC patients (1.91 ± 1.21 vs. 1.22 ± 0.52 , $p = 0.003$). Thus, *BLVRA* may act as a feedback mechanism to scavenge superoxide overproduced by increased *NOX2*.²⁶

It is also important to emphasize the importance of the PBL as a biological material to be used for screening expression studies. The PBL are easily available from blood sampling, and their gene expression profiles are more reliable compared to liver cancers often containing necrotic tissues.⁴⁴

CONCLUSION

In conclusion, we observed increased *BLVRA* mRNA level in the liver as well as in PBL in HCC patients, which seems to be a feedback mechanism to control increased oxidative stress associated with HCC progression, as evidenced by increased *NOX2* mRNA levels in PBL of these patients. We were not able to assess either the *BLVRA* protein levels or *BLVRA* enzyme activities in our biological samples; thus further studies aimed to deeper analyze *BLVRA* as a possible therapeutic target are certainly needed.

ABBREVIATIONS

- **AFP:** α 1-fetoprotein.
- **ALD:** alcoholic liver disease.

- **ALT:** alanine aminotransferase.
- **AST:** aspartate aminotransferase.
- **ALP:** alkaline phosphatase.
- **BLVR:** biliverdin reductase.
- **BLVRA:** biliverdin reductase A.
- **BLVRB:** biliverdin reductase B.
- **GGT:** gamma glutamyl transpeptidase.
- **HBV:** viral hepatitis B.
- **HCC:** hepatocellular carcinoma.
- **HCV:** viral hepatitis C.
- **HMOX1:** heme oxygenase 1.
- **HPRT:** hypoxanthine phosphoribosyl transferase.
- **INR:** international normalized ratio of prothrombin time.
- **NASH:** non-alcoholic steatohepatitis.
- **NOX2:** NADPH oxidase 2.
- **PBL:** peripheral blood leukocytes.
- **RONS:** reactive nitrogen species.
- **ROS:** reactive oxygen species.
- **TGF:** transforming growth factor.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant IGA MZ NT 13092-4/2012 from the Czech Ministry of Health.

REFERENCES

1. Ferlay J, Shin R, Bray F, al. e. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.10. Available at <http://www.iarc.fr/en/media-centre/iarc-news/2010/globocan2008.php>. Access: Feb 15, 2016.
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65: 87-108.

3. Kew MC. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in sub-Saharan Africa. *Ann Hepatol* 2013; 12: 173-82.
4. Llovet JM. Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2005; 40: 225-35.
5. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006; 45: 529-38.
6. Caldwell SH, Crespo DM, Kang HS, Al-Osaimi AM. Obesity and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127: S97-S103.
7. Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J, Kramer BS, Lencioni R, Zhu AX, Sherman M, et al. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 698-711.
8. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011; 53: 1020-2.
9. Singal A, Volk ML, Waljee A, Salgia R, Higgins P, Rogers MA, Marrero JA. Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30: 37-47.
10. Sherman M. Serological surveillance for hepatocellular carcinoma: time to quit. *J Hepatol* 2010; 52: 614-5.
11. Colombo M. Screening for cancer in viral hepatitis. *Clin Liver Dis* 2001; 5: 109-22.
12. Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, Filmus J. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2003; 125: 89-97.
13. Marrero JA, Su GL, Wei W, Emick D, Conjeevaram HS, Fontana RJ, Lok AS. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in American patients. *Hepatology* 2003; 37: 1114-21.
14. Quinn MT, Gauss KA. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with non-phagocyte oxidases. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 760-81.
15. Lee YS, Kang YS, Lee JS, Nicolova S, Kim JA. Involvement of NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species in the apoptotic cell death by capsaicin in HepG2 human hepatoma cells. *Free Radic Res* 2004; 38: 405-12.
16. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87: 245-313.
17. Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 2006; 86: 583-650.
18. Was H, Dulak J, Jozkowicz A. Heme oxygenase-1 in tumor biology and therapy. *Curr Drug Targets* 2010; 11: 1551-70.
19. Vitek L, Schwertner HA. The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Adv Clin Chem* 2007; 43: 1-57.
20. Cunningham O, Gore MG, Mantle TJ. Initial-rate kinetics of the flavin reductase reaction catalysed by human biliverdin-IX-beta reductase (BVR-B). *Biochem J* 2000; 345, Pt. 2: 393-9.
21. O'Brien L, Hosick PA, John K, Stec DE, Hinds TD, Jr. Biliverdin reductase isozymes in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2015; 26: 212-20.
22. Lerner-Marmarosh N, Shen J, Torno MD, Kravets A, Hu Z, Maines MD. Human biliverdin reductase: a member of the insulin receptor substrate family with serine/threonine/tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 7109-14.
23. Wegiel B, Baty CJ, Gallo D, Csizmadia E, Scott JR, Akhavan A, Chin BY, et al. Cell surface biliverdin reductase mediates biliverdin-induced anti-inflammatory effects via phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. *J Biol Chem* 2009; 284: 21369-78.
24. Gibbs PE, Miralem T, Maines MD. Biliverdin reductase: a target for cancer therapy? *Front Pharmacol* 2015; 6: 119.
25. Subhanova I, Muchova L, Lenicek M, Vreman HJ, Luksan O, Kubičková K, Kreidlova M, et al. Expression of biliverdin reductase A in peripheral blood leukocytes is associated with treatment response in HCV-infected patients. *PLoS One* 2013; 8: e57555.
26. Choi J, Corder NL, Koduru B, Wang Y. Oxidative stress and hepatic Nox proteins in chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Free Radic Biol Med* 2014; 72: 267-84.
27. Elchuri S, Oberley TD, Qi W, Eisenstein RS, Jackson Roberts L, Van Remmen H, Epstein CJ, et al. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* 2005; 24: 367-80.
28. Tsukiyama-Kohara K. Role of oxidative stress in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis C virus. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 15271-8.
29. Crosas-Molist E, Bertran E, Fabregat I. Cross-Talk Between TGF-beta and NADPH Oxidases During Liver Fibrosis and Hepatocarcinogenesis. *Curr Pharm Des* 2015; 21: 5964-76.
30. Pal S, Polyak SJ, Bano N, Qiu WC, Carithers RL, Shuhart M, Gretch DR, et al. Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 627-34.
31. Lanone S, Bloc S, Foresti R, Almolki A, Taille C, Callebort J, Conti M, et al. Bilirubin decreases nos2 expression via inhibition of NAD(P)H oxidase: implications for protection against endotoxin shock in rats. *FASEB J* 2005; 19: 1890-2.
32. Fujii M, Inoguchi T, Sasaki S, Maeda Y, Zheng J, Kobayashi K, Takayanagi R. Bilirubin and biliverdin protect rodents against diabetic nephropathy by downregulating NAD(P)H oxidase. *Kidney Int* 2010; 78: 905-19.
33. Berberat PO, Dambrasas Z, Gulbinas A, Giese T, Giese N, Kunzli B, Autschbach F, et al. Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3790-8.
34. Exner M, Minar E, Wagner O, Schillinger M. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Rad Biol Med* 2004; 37: 1097-104.
35. Caballero F, Meiss R, Gimenez A, Battle A, Vazquez E. Immunohistochemical analysis of heme oxygenase-1 in preneoplastic and neoplastic lesions during chemical hepatocarcinogenesis. *Int J Exp Pathol* 2004; 85: 213-21.
36. De Giorgi V, Buonaguro L, Worschech A, Tornesello ML, Izzo F, Marincola FM, Wang E, et al. Molecular signatures associated with HCV-induced hepatocellular carcinoma and liver metastasis. *PLoS One* 2013; 8: e56153.
37. Arena V, Pennacchia I, Guerriero G, Mancuso C. The heme oxygenase/biliverdin reductase system in skin cancers. *J Biol Regul Homeost Agents* 2015; 29: 259-64.
38. Maines MD, Mayer RD, Erturk E, Huang TJ, Disantagnese A. The oxidoreductase, biliverdin reductase, is induced in human renal carcinoma-pH and cofactor-specific increase in activity. *J Urol* 1999; 162: 1467-72.
39. Hellman K, Alaiya AA, Becker S, Lomnyska M, Schedvins K, Steinberg W, Hellstrom AC, et al. Differential tissue-specific protein markers of vaginal carcinoma. *Br J Cancer* 2009; 100: 1303-14.
40. Melle C, Ernst G, Scheibner O, Kaufmann R, Schimmel B, Bleul A, Settmacher U, et al. Identification of specific protein markers in microdissected hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res* 2007; 6: 306-15.

41. Huan L, Bao C, Chen D, Li Y, Lian J, Ding J, Huang S, et al. MiR-127-5p targets the biliverdin reductase B/NF-kappaB pathway to suppress cell growth in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Sci* 2016; 10.1111/cas.12869.
42. Kim SY, Kang HT, Choi HR, Park SC. Biliverdin reductase A in the prevention of cellular senescence against oxidative stress. *Exp Mol Med* 2011; 43: 15-23.
43. Miralem T, Hu ZB, Torno MD, Lelli KM, Maines MD. Small interference RNA-mediated gene silencing of human biliverdin reductase, but not that of heme oxygenase-1, attenuates arsenite-mediated induction of the oxygenase and increases apoptosis in 293A kidney cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 17084-92.
44. Kim SS, Seong S, Lim SH, Kim SY. Biliverdin reductase plays a crucial role in hypoxia-induced chemoresistance in human glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 440: 658-63.

Correspondence and reprint request:

Libor Vitek, MD, PhD
 Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics,
 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Na Bojišti
 3, Praha 2, 12000, Czech Republic
 Tel.: +420 2 2496 4203, Fax: +420 2 2496 4203
 E-mail: vitek@cesnet.cz

8.2 Příloha 2

Subhanova I, Muchova L, Lenicek M, Vreman HJ, Luksan O, **Kubickova K**, Kreidlova M, Zima T, Vitek L, Urbanek P: Expression of biliverdin reductase A in peripheral blood leukocytes is associated with treatment response in HCV-infected patients. PLOS ONE 2013; 8(3): e57555. **IF 4,09**

Expression of Biliverdin Reductase A in Peripheral Blood Leukocytes Is Associated with Treatment Response in HCV-Infected Patients

Iva Subhanova^{1*}, Lucie Muchova¹, Martin Lenicek¹, Hendrik J. Vreman², Ondrej Luksan³, Kristyna Kubickova⁴, Miluse Kreidlova¹, Tomas Zima¹, Libor Vitek^{1,5}, Petr Urbanek^{4,5}

1 Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, General University Hospital and 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic, **2** Department of Pediatrics, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, United States of America, **3** Centre of Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic, **4** Department of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic, **5** 4th Department of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Abstract

Background and Aims: Hepatitis C virus (HCV) infection is associated with systemic oxidative stress. Since the heme catabolic pathway plays an important role in antioxidant protection, we attempted to assess the gene expression of key enzymes of heme catabolism, heme oxygenase 1 (HMOX1), heme oxygenase 2 (HMOX2), and biliverdin reductase A (BLVRA) in the liver and peripheral blood leukocytes (PBL) of patients chronically infected with HCV.

Methods: Gene expressions (*HMOX1*, *HMOX2*, *BLVRA*) and HCV RNA were analyzed in PBL of HCV treatment naïve patients ($n = 58$) and controls ($n = 55$), with a subset of HCV patients having data on hepatic gene expression ($n = 35$). Based upon the therapeutic outcome, HCV patients were classified as either responders ($n = 38$) or treatment-failure patients ($n = 20$). Blood samples in HCV patients were collected at day 0, and week 12, 24, 36, and 48 after the initiation of standard antiviral therapy.

Results: Compared to the controls, substantially increased *BLVRA* expression was detected in PBL ($p < 0.001$) of therapeutically naïve HCV patients. mRNA levels of *BLVRA* in PBL closely correlated with those in liver tissue ($r_2 = 0.347, p = 0.03$). A marked difference in *BLVRA* expression in PBL between the sustained responders and patients with treatment failure was detected at week 0 and during the follow-up ($p < 0.001$). Multivariate analysis revealed that *BLVRA* basal expression in PBL was an independent predictor for sustained virological response (OR 15; 95% CI 1.05–214.2; $P = 0.046$). *HMOX1/2* expression did not have any effect on the treatment outcome.

Conclusion: Our results suggest that patients with chronic HCV infection significantly upregulate *BLVRA* expression in PBL. The lack of *BLVRA* overexpression is associated with non-responsiveness to standard antiviral therapy; whereas, *HMOX1/2* does not seem to have any predictive potential.

Citation: Subhanova I, Muchova L, Lenicek M, Vreman HJ, Luksan O, et al. (2013) Expression of Biliverdin Reductase A in Peripheral Blood Leukocytes Is Associated with Treatment Response in HCV-Infected Patients. PLoS ONE 8(3): e57555. doi:10.1371/journal.pone.0057555

Editor: Hans Tillmann, Duke University, United States of America

Received: April 17, 2012; **Accepted:** January 26, 2013; **Published:** March 11, 2013

Copyright: © 2013 Subhanova et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by grant IGA MZ NT/13092-4/2012 from the Czech Ministry of Health. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: iva.subhanova@seznam.cz

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection represents one of the leading causes of chronic hepatitis worldwide, resulting in progression into fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma in a significant number of HCV-infected patients [1]. The HCV prevalence is estimated to be 3% worldwide [2] and 0.2–0.5% in the Czech Republic with predominance of genotype 1 (79.3%) and 3 (19.7%) [3,4].

Although HCV is mainly hepatotropic, there is also evidence that it can replicate in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with chronic HCV infection [5].

Oxidative damage has been hypothesized to play a role in HCV-induced liver disease, with reactive oxygen and nitrogen species (RONS) generated from HCV-infected hepatocytes, and infiltrating the immune cells [6,7]. HCV might not only increase RONS production, but also downregulate expression of certain antioxidant genes, including heme oxygenase (HMOX) [8]. HMOX catalyzes the degradation of the pro-oxidative heme to biliverdin, carbon monoxide (CO), and iron (Figure 1). Biliverdin is then subsequently reduced to bilirubin by biliverdin reductase (BLVR). Biliverdin, bilirubin, and CO exert numerous biological functions, including anti-oxidative and anti-inflammatory effects, as well as the modulation of cell proliferation and apoptosis

[9,10,11]. Two HMOX isoforms have evolved, which include HMOX1 (OMIM*141250), an inducible isoenzyme, and HMOX2 (OMIM*141251), a constitutive isoform. Both catalyze the same reaction, but are differentially regulated, and play different roles in protecting tissues against oxidative injuries [12]. An accumulating body of evidence suggests that *HMOX1* overexpression contributes to cellular response against oxidative stress [13], and might have strong anti-fibrotic, as well as an anti-apoptotic potential within the liver tissue [14,15]. *HMOX1* induction *in vitro* has recently been shown to decrease HCV replication [16]. On the other hand, reduced *HMOX1* expression has been reported in the liver tissue of patients with chronic hepatitis C [8]; although under *in vitro* conditions hepatic *HMOX1* overexpression in the presence of HCV proteins has been reported by other authors [17].

BLVR, the other enzyme involved in the heme catabolic pathway, is also implicated in the oxidative stress response [18]. Apart from its antioxidative effects, a cytoprotective action independent of heme degradation has been reported [19,20]. In fact, BLVR has been demonstrated to affect cell signaling pathways by regulating stress-responsive genes, including both *HMOX1* [21,22], and *HMOX2* [23]. Two isoforms of human BLVR, BLVRA (OMIM*109750) and BLVRB (OMIM*600941), products of different genes, have been described [24]. *BLVRA*, the major form of BLVR in the human adult liver, is subject to regulation by tumor necrosis factor- α , as well as by oxidative stress or hypoxia [25]. Importantly, biliverdin has been shown to inhibit HCV replication [26]. Lehmann *et al.* [26] recently demonstrated that biliverdin interferes with HCV replication-mediated oxidative stress by inducing the expression of antiviral interferons. Huang *et al.* [27] reported an association between sustained virological response (SVR) and expression of *BLVRB*, the embryonic form of BLVR in PBMC during the first weeks of antiviral therapy. However, no data are available on *BLVRA* expression in the liver, or PBL in chronic HCV infection.

Therefore, the present study was conducted to evaluate the possible role of HCV infection on *HMOX1/HMOX2/BLVRA* gene

expression in the liver and PBL, as well as whether these genes may influence or predict the treatment response.

Patients and Methods

Patients

The study was performed on 58 consecutive therapeutically naïve patients with chronic HCV infection. The patients were recruited between 2007–2011 at the Hepatology Center in the Central Military Hospital in Prague, Czech Republic. Patients with positivity of anti-HCV antibodies, and detectable HCV RNA in serum for at least 6 months, were included in the study. Detailed description of patients enrolled is given in Table 1.

The patients received standard antiviral therapy (pegylated interferon alpha in combination with ribavirin (PEG-IFN-alpha/RBV)) according to EASL and AASLD practice guidelines [28]. The treatment regimens were: 1) PEG-IFN alpha 2a (Pegasys; Roche, Basel, Switzerland): 180 μ g once weekly+RBV (Copegus; Roche, Basel, Switzerland) 1000–1200 mg daily, according to body weight (1000 mg \leq 75 kg, 1200 mg $>$ 75 kg); and 2) PEG-IFN alpha-2b (PegIntron; Schering-Plough, Kenilworth, NJ, USA): 1.5 μ g/kg body weight once weekly+RBV (Rebetol; Schering-Plough, Kenilworth, NJ, USA): 1000–1200 mg daily, according to body weight (1000 mg \leq 75 kg, 1200 mg $>$ 75 kg).

The total duration of the antiviral therapy was defined by the type of antiviral response within the first 12–24 weeks of therapy. Patients with HCV RNA decrease <2 log from baseline level at week 12 were classified as null responders and their antiviral therapy was terminated at week 12. Patients with HCV RNA decrease ≥ 2 log or with undetectable HCV RNA at week 12 were treated to week 24. If HCV RNA was detectable at week 24, patients were classified as slow responders and their therapy was terminated at week 24. Only patients with undetectable HCV RNA at week 24 were treated up to week 48.

Based on the treatment response, patients were classified into two groups. Responders were defined as patients with sustained virologic response (SVR, undetectable HCV RNA at weeks 24 after completion of antiviral therapy, $n=38$). Treatment-failure patients (non-SVR, $n=20$) included those who did not achieved SVR ($n=15$) and patients who relapsed ($n=5$).

For PBMC and PBL studies, 55 healthy volunteers (blood donors or employees of General Faculty Hospital and 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague) were used as control subjects. The study was registered under ID: NCT 00842250 (www.clinicaltrials.gov).

The study protocol conformed to all ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki, reflected in the *a priori* approval by the institution's Ethics Committee. Additionally, all subjects in this study had provided written informed consent.

Methods

Material sampling and storage. Patients' blood samples were collected on the day before treatment initiation (day 0, $n=58$), as well as at 12 ($n=37$), 24 ($n=31$), 36 ($n=27$) and 48 ($n=16$) weeks after initiation of the standard antiviral treatment. Samples for gene expression analyses were collected into PAXgene Blood RNA Tubes (PreAnalytix, Hombrechtikon, Switzerland) and stored at -80°C . Samples for determination of total HMOX activity in PBMC were collected in BD Vacutainer Blood collection tubes with heparin (BD Diagnostics-Preanalytical Systems, Franklin Lakes, NJ, USA). PBMC were isolated through a Ficoll-density gradient within 5 hours, and stored in potassium phosphate buffer at -80°C . The blood samples for analysis of interleukin 28B (*IL28B*, OMIM*607402) gene polymorphism were

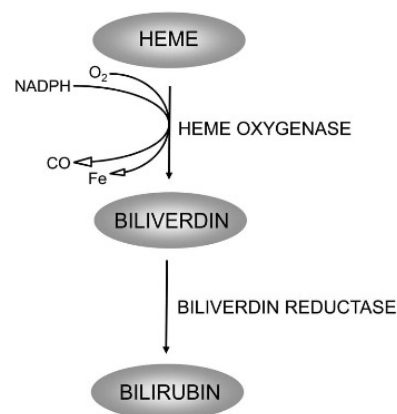


Figure 1. Heme catabolic pathway. Heme oxygenase, the rate limiting enzyme in the heme catabolic pathway, catalyzes oxidative degradation of heme to form equimolar amounts of bioactive products carbon monoxide, iron and biliverdin, which is subsequently reduced to bilirubin by biliverdin reductase.
doi:10.1371/journal.pone.0057555.g001

Table 1. Baseline characteristics of patients with hepatitis C.

	Controls (N = 55)	HCV (N = 58)	SVR (N = 38)	NVR (N = 20)	p-value*
Gender (M:F ratio)	0.49	1.2	1.0	1.9	0.28
Age (years)	32.5 (27.8–44.0)	45.0 (38.0–53.8)	43.5 (37.3–51.8)	46.0 (43.5–54.0)	0.22
Viral load (log IU/ml)		6.05 ± 0.67	6.05 ± 0.75	6.05 ± 0.50	0.98
Genotype HCV 1 (%)		84	76	94	0.20
<i>IL28B</i> (rs12979860)CC(%)		37	44	22	0.11
HMOX activity PBMC	36.3 ± 18.1	20.6 ± 16.3 (N = 53)	19.1 ± 17.6 (N = 34)	22.7 ± 19.3 (N = 19)	0.47
<i>HMOX1</i> expression PBL	4.0 ± 0.89	3.45 ± 2.03	3.63 ± 1.91	3.15 ± 2.31	0.71
<i>HMOX2</i> expression PBL	4.98 ± 0.94	4.30 ± 1.13	4.22 ± 0.97	4.41 ± 1.41	0.72
<i>BLVRA</i> expression PBL	1.28 ± 0.36	1.68 ± 0.68	1.87 ± 0.74	1.32 ± 0.34	<0.001
Liver histology grading		5(4–5)	5(3–5)	4.5(4–6)	0.36
Liver histology staging		1(1–3)	1(1–2)	3.0(1–5)	0.03
Total bilirubin (μmol/l)		15.9 (12.4–19.4)	15.0 (11.4–20.6)	16.7 (14.6–18.3)	0.66
ALT (μkat/l)		0.97 (0.77–1.80)	0.93 (0.76–1.39)	1.08 (0.85–2.19)	0.95
AST (μkat/l)		0.67 (0.53–1.21)	0.63 (0.49–1.25)	0.79 (0.58–1.13)	0.71
ALP (μkat/l)		1.28 (0.99–1.95)	1.28 (1.05–2.02)	1.32 (0.99–1.83)	0.19
GGT (μkat/l)		0.68 (0.49–1.76)	0.57 (0.41–1.69)	1.15 (0.66–1.96)	0.73
Hemoglobin (g/l)		146.9 ± 16.6	143.5 ± 17	153.4 ± 14.1	0.02
Platelets (x 10 ⁹ /l)		195.5 ± 63.4	205.5 ± 66.4	177.0 ± 54.1	0.08

HCV, hepatitis C virus; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PBL, peripheral blood leukocytes; SVR, responders; NVN, non-SVR patients; HMOX1, 2, heme oxygenase 1, 2; BLVRA, biliverdin reductase A; ALT, serum alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; GGT, gamma glutamyl transpeptidase; N = number of patients; HMOX activity expressed as pmol CO/hr/10⁶ cells. Data expressed as mean ± standard deviation (SD), or median (IQR range). *P-value calculated between SVR and NVN.

doi:10.1371/journal.pone.0057555.t001

collected in BD Vacutainer Blood collection tubes with EDTA (BD Diagnostics-Precanalytical Systems, Franklin Lakes, NJ, USA) and stored at –80°C.

All liver samples were immediately placed into RNeasy lysis buffer (Qiagen, Crawley, UK) and stored at –80°C until total RNA isolation.

Reagents. Hemin, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) and sulfosalicylic acid were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Sodium dihydrogen phosphate (NaH₂PO₄) and disodium hydrogen phosphate (Na₂HPO₄) were of analytical grade, and purchased from Penta (Prague, Czech Republic).

Markers of liver injury. Liver biopsy samples were evaluated according to the Ishak scoring system [29]. Serum markers of liver injury (ALT, AST, GGT, ALP) and bilirubin were analyzed by routine assays on an automated analyzer (Modular analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Serological analyses. HCV RNA in sera was quantified using Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan (detection limit of 15 IU/ml) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). HCV genotypes were analysed with VERSANT HCV Genotype 2.0 Assay (LiPA) (Siemens Healthcare Diagnostics, Camberley, UK).

Genomic DNA isolation and *IL28B* genotyping. Genomic DNA was extracted from EDTA coagulated peripheral blood using MagNA Pure Compact Nucleic acid isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The human *IL28B* promoter polymorphism at position –3176 (rs12979860) was analysed using LightMix Kit *IL28B* (TIB Molbiol GmbH, Berlin, Germany).

Total RNA isolation and reverse transcription. The liver tissue was homogenized using a MagNA Lyser System (Roche

Applied Science, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. Total RNA from the homogenized liver tissue was isolated using RNeasy Mini (Qiagen, Dallas, TX, USA), and total RNA from PBL using a PAXgene kit (Qiagen, Dallas, TX, USA), according to the manufacturer's instructions. DNase treatment with the RNase-free DNase (Qiagen, Dallas, TX, USA), prior to cDNA synthesis, was carried out according to the manufacturer's instructions. The RNA integrity was checked by agarose gel electrophoresis. First-strand cDNA was synthesized from 0.2 μg of total RNA in a final volume of 20 μl using a High-Capacity cDNA kit according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

RealTime HCV RNA and gene expression quantification. The HCV Primer sequences were based on data by Carriere et al. [30]. Other primers were designed using Primer 3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Accessed 2013 Feb 1) and synthesized by Generi Biotech (Hradec Kralove, Czech Republic) (Table 2).

To determine the relative expression level of all data analysis, *HPRT* expression levels were measured as internal controls. The delta cycle threshold value (Δct) was calculated from the given *ct* value by the formula: $\Delta ct = (ct \text{ sample} - ct \text{ control})$. The fold change was calculated as $(= 2^{-\Delta ct})$. Two reference genes (*HPRT*, *GAPD*) were selected as the most stable among 4 constant genes (*HPRT*, *GAPD*, *18S RNA*, *UBC*) based on the analyses of 10 PBL of HCV infected patients and controls, and 10 liver samples of HCV infected patients by using geNorm 3.5 (<http://medgen.ugent.be/genorm>). Accessed 2009 Dec 15). Based upon similar expression levels as target genes, *HPRT* was found a more appropriate control gene, compared to *GAPD*.

qPCR was performed in 20 μl reaction volume, containing 4 μl of five-fold diluted cDNA template from completed RT reaction,

Table 2. Primer sequences for HCV RNA, target and internal control genes.

	Forward primer	Reverse primer	Product PCR(bp)
HCV	GTCTAGCCATGGCGTAGTA	CTCCCGGGGCACTCGCAAGC	246
HMOX1	GGGTGATAGAAGAGGCAAGA	AGCTCTGCAACTCCTCAAA	67
HMOX2	GAAGGAAGGGACCAAGGAAG	CTCTCGAGGGCTGAGTATG	139
BLVRA	TCCCTCTTTGGGAGCTTTC	GGACCCAGACTTGAATGGAAG	180
HPRT	CACTGGCAAACAATGCAGAC	GGGTCTTTTACACAGCAAG	92

HCV, hepatitis C virus; HMOX1, 2, heme oxygenase 1, 2; BLVRA, biliverdin reductase A; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase.
doi:10.1371/journal.pone.0057555.t002

1× SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and 200 nM forward and reverse primers. All RT-PCR were set up in 96-well optical plates, and run on an ABI PRISM 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

The cycling conditions included polymerase activation at 95°C for 10 min, followed with 40 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 60 s. PCR products were subjected to a melting curve analysis. All samples were analyzed in triplicates. Linearized constructs for the PCR validation procedure were prepared using a TOPO TA Cloning Kit, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). PCR efficiencies for target and housekeeping cDNA were 97–105%.

HMOX activity in PBMC. Twenty µl of PBMC sonicate (2 million cells per reaction) were incubated for 15 min at 37°C in CO-free septum-sealed vials containing 20 µl of 150 µM met-hemalbumin and 20 µl of 4.5 mM NADPH, as previously described [31]. Blank reaction vials contained 0.1 M phosphate buffer, pH=7.4 in place of NADPH. The reactions were terminated by adding 5 µl of 30% (w/v) sulfosalicylic acid. The amount of CO generated by the reaction and released into the vial headspace was quantified by gas chromatography (GC) with a Reduction Gas Analyzer (Trace Analytical Laboratories, now: AMETEK Process Instrument, Newark, DE, USA). HMOX activity was calculated as pmol CO/hr/10⁶ cells.

Statistical analysis. The data are presented as the mean ± standard deviation (SD), or median (IQ range). Differences between the studied groups (HCV vs. controls, SVR vs. treatment-failure patients) were evaluated by an unpaired t-test, or Mann-Whitney U test. The significance of the relationship between *BLVRA* expression and the treatment outcome was determined by the chi-square test. Linear regression, Pearson's correlation and multivariate logistic regression analyses were performed using SigmaStat software, version 3.01, for the statistical analysis. For multiple logistic regression analysis following clinically relevant variables were included: *BLVRA* expression in PBL, *IL28B* gene variants, HCV RNA levels, stage of liver fibrosis, gender, hemoglobin levels and platelet number. All analyses were performed with alpha set to 0.05.

Results

Basal Expression of *BLVRA* in PBL of HCV Patients

BLVRA expression in PBL was markedly increased in HCV-infected patients before antiviral treatment, when compared to the control group (1.68 ± 0.68 vs. 1.28 ± 0.36 , respectively, $p < 0.001$). Simultaneously, baseline mRNA levels of *BLVRA* were significantly higher only in patients who achieved SVR, compared to the control group (1.87 ± 0.74 vs. 1.28 ± 0.36 , respectively, $p < 0.001$), but not in non-SVR patients (1.32 ± 0.34 vs. 1.28 ± 0.36 $p = 0.65$).

The *BLVRA* expression in PBL of relapse patients ($n = 5$) before antiviral treatment was substantially reduced compared to SVR patients (1.15 ± 0.19 vs. 1.87 ± 0.74 , $p < 0.001$), and was also decreased, although non-significantly, when compared to non-SVR patients ($n = 15$) (1.15 ± 0.19 vs. 1.32 ± 0.34 , $p = 0.09$). Significant differences in basal *BLVRA* expression were found between SVR and non-SVR patients (Table 1). When assessing possible factors responsible for treatment response, only *BLVRA* expression has been found to be a strong predictor (Table 3). Exclusion of *BLVRA* from multivariate analysis did not have any effect on predictive value of tested variables. Based on ROC analysis (Figure 2), *BLVRA* expression predicted the treatment response with 76% sensitivity, 70% specificity (positive predictive value = 83%, negative predictive value = 61%). Since ribavirin treatment is commonly associated with hemolysis, and bilirubin overproduction might upregulate *BLVRA*, we assessed the relationship between ribavirin-induced drop of hemoglobin levels and *BLVRA* expression (Table 4). However, no changes in *BLVRA* expression were detected either in 12 or 24 weeks of antiviral therapy in hemoglobin depleted patients.

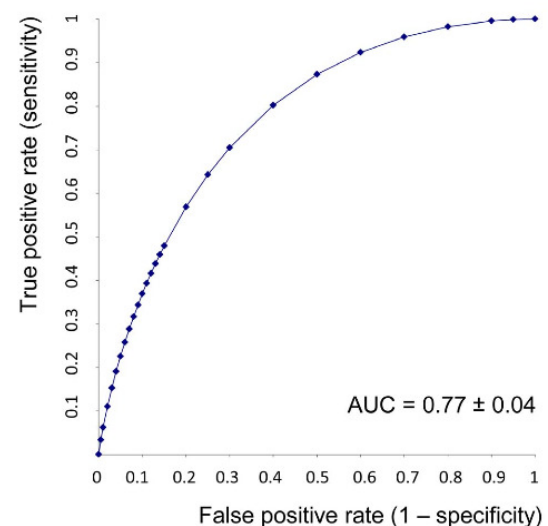


Figure 2. ROC curve of *BLVRA* expression in peripheral blood leukocytes of HCV infected patients. AUC, area under the ROC curve; ROC, Receiver Operating Characteristic.
doi:10.1371/journal.pone.0057555.g002

Table 3. Multivariate logistic regression analysis of potential SVR predictors.

	OR	95% CI	P-value
BLVRA expression PBL	15	1.05–214.2	0.046
<i>IL28B</i> (rs12979860)	3.05	0.39–24	0.29
HCV RNA	1.45	0.37–5.6	0.59
Liver fibrosis	0.76	0.4–1.5	0.4
Sex	1.81	0.13–2.5	0.66
Hemoglobin	0.94	0.88–1.01	0.09
Platelets	1.01	0.94–1.03	0.18

SVR, responders; HCV, hepatitis C virus; *IL28B*, interleukin 28B; PBL, peripheral blood leukocytes; BLVRA, biliverdin reductase A; OR, odds ratio; CI, confidence interval.
IL28B genotype was tested as CC vs. non-CC allele carriers.
doi:10.1371/journal.pone.0057555.t003

Expression of BLVRA in PBL in HCV Patients during Antiviral Treatment

BLVRA expression significantly increased at weeks 12 (2.57 ± 1.61 , $p = 0.0004$), 24 (2.57 ± 1.17 , $p = 0.0002$), and 36 (2.16 ± 1.19 , $p = 0.03$) after initiation of standard antiviral therapy when compared to the initial levels (1.68 ± 0.68). Significant differences in *BLVRA* mRNA levels between SVR and non-SVR patients were found at weeks 12 and 48 after treatment initiation. Similar trends were also observed at weeks 24 and 36. These differences, however, did not reach statistical significance, most likely due to the low number of subjects (Figure 3). Interestingly, *BLVRA* expression in SVR patients after withdrawal of antiviral therapy ($n = 10$) decreased substantially compared to *BLVRA* expression levels at week 24 (median [IQ range] 1.38 [1.2–1.6] vs. 2.52 [1.5–2.8], $p = 0.03$), and reached control levels (median [IQ range] 1.38 [1.2–1.6] vs. 1.28 [1–1.5], $p = 0.43$).

Expression and Activity of HMOX in HCV Patients

Compared to controls, the HMOX activity in PBMC of HCV-infected patients before antiviral treatment was substantially reduced (20.6 ± 16.3 vs. 36.3 ± 18.1 pmol CO/ 10^6 cells/h, respectively, $p = 0.001$). Although PBL gene expression of *HMOX1* did not differ between HCV-infected patients and the control group, the *HMOX2* expression was slightly, but significantly, reduced in patients with HCV infection (4.30 ± 1.13 vs. 4.98 ± 0.94 , respectively, $p = 0.001$). While a significant correlation between PBL gene expression of *HMOX1*, *HMOX2* mRNA and HMOX activity

in PBMC was only detected in control samples ($r^2 = 0.210$, $p = 0.007$; $r^2 = 0.113$, $p = 0.03$), this relationship was not observed in the HCV-infected patients ($r^2 = 0.040$, $p = 0.20$; $r^2 = 0.046$, $p = 0.33$). Finally, no differences in either HMOX activity or *HMOX* expression between SVR and non-SVR patients were detected.

Correlation between BLVRA and HMOX mRNA Levels in the Liver and PBL, and HCV RNA in PBL and Liver Tissue

No significant differences in pretreatment expression of *BLVRA* in the liver were found between SVR ($n = 18$) and non-SVR patients ($n = 4$) (0.35 ± 0.24 vs. 0.34 ± 0.24 , $p = 0.97$) most likely because of high variability of *BLVRA* expression in the liver compared to PBL.

BLVRA expression, but not that of *HMOX1/HMOX2*, in the liver and PBL of HCV-infected patients were in direct relationship ($n = 13$, $r^2 = 0.347$, $p = 0.03$). No correlation was found between the mRNA levels of *HMOX1/HMOX2/BLVRA* and HCV RNA in the liver and PBL.

Discussion

Because of the side effects and high costs of current antiviral therapy, it is very important to identify those markers that can discriminate among those patients who will respond to the standard treatment. The precise molecular mechanisms underlying the responsiveness to antiviral treatment among HCV-infected individuals have yet to be completely identified.

Enzymes of the heme catabolic pathway seem to belong to such promising markers. In fact, Zhu and coworkers [32] recently provided a plausible mechanism for the antiviral activity of HMOX1, demonstrating that the direct product of its activity, biliverdin, potentially inhibits viral replication at biologically relevant concentrations in human hepatoma Huh-7.5 cells replicating HCV RNA, most likely *via* inhibition of HCV NS3/4A protease. In the current study, we prospectively investigated HMOX activity, as well as *HMOX1* expression in HCV-infected patients. Surprisingly, no difference in mRNA expression of *HMOX1* in PBL was found between therapeutically naïve HCV patients and controls, although the total HMOX activity in PBMC was significantly decreased in HCV patients before treatment, compared to the control group.

Furthermore, a correlation between the expression of *HMOX1*, *HMOX2*, and total HMOX activity was only detected in the control samples; not in the HCV-infected patients. In fact, interference of HCV with HMOX1 induction [33], reduced hepatic expression of *HMOX1* both *in vitro* and *in vivo* in HCV

Table 4. The impact of ribavirin-induced anemia on BLVRA expression.

	anemia		P-value	Hb drop		P-value
	Hb <100 g/L	Hb >100 g/L		<30 g/L	>30 g/L	
week 12						
incidence (%)	8.6	91.4		38	62	
BLVRA expression	2.6 ± 1.7	2.53 ± 0.9	0.85	2.1 ± 1.1	2.53 ± 0.9	0.31
week 24						
incidence (%)	27.8	72.2		50	50	
BLVRA expression	2.46 ± 1.6	2.82 ± 0.7	0.73	2.59 ± 1.2	2.72 ± 0.8	0.78

BLVRA, biliverdin reductase A; HB, hemoglobin.
doi:10.1371/journal.pone.0057555.t004

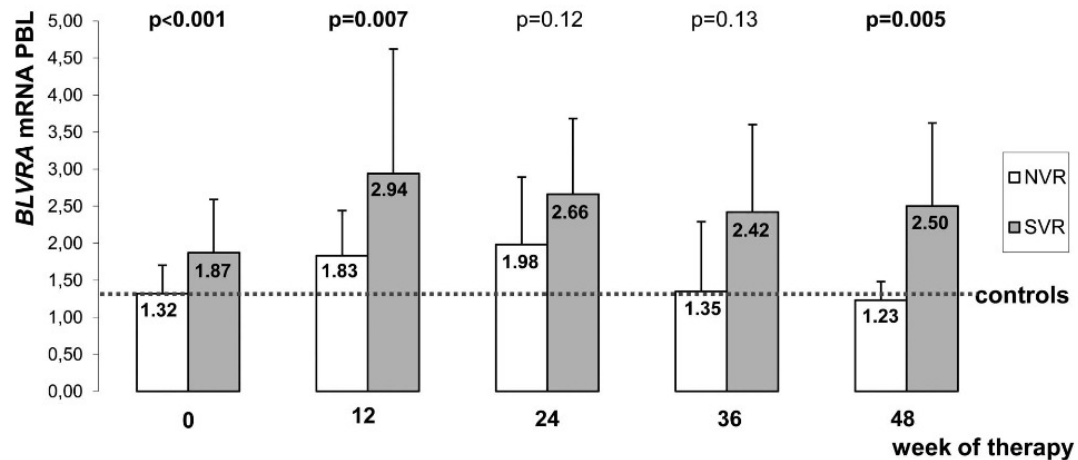


Figure 3. *BLVRA* expression in peripheral blood leukocytes of responders and non-SVR patients during standard antiviral therapy. *BLVRA* expression was measured the day before treatment initiation (0), and 12, 24, 36 and 48 weeks after start of the standard treatment. Data represent means and standard deviations for triplicate determinations. P-values calculated between responders and non-SVR patients. *BLVRA*, biliverdin reductase A; PBL, peripheral blood leukocytes; SVR = responders, NVR = non-SVR patients. doi:10.1371/journal.pone.0057555.g003

infection [8]; additionally, induced hepatic *HMOX1* expression *in vitro* were reported [17]. We hypothesized that *HMOX* and *BLVRA* gene expression in PBL can reflect their expression in the liver. In our study, due to unavailability of liver specimens of control subjects, correlation between the liver and PBL could be analyzed only in HCV patients. No association of *HMOX1/HMOX2* expression was found between the liver and PBL, and *HMOX1/HMOX2/BLVRA* and HCV RNA in the liver and PBL. On the other hand, expression of *BLVRA* in the liver tissue correlated with expression of *BLVRA* in PBL. The expression of *BLVRA* in PBL was higher in HCV-infected patients before antiviral therapy, compared to the control group; and subsequently increased 12, 24, and 36 weeks after initiation of standard antiviral therapy, when compared to initial levels. Most importantly, *BLVRA* expression in PBL was found to be strongly associated with response to the antiviral treatment. Recent genome-wide association studies identified strong evidence *IL28B* gene variation (rs12979860) with SVR rates in patients chronically infected with genotype 1 HCV [34,35,36]. Although not statistically significant, a similar trend was observed in our cohort of patients for all genotypes ($p=0.11$) as well as for genotype 1 ($p=0.16$). The prevalence of CC vs non CC genotypes in our group of patients corresponds to prevalence rates of chronically infected HCV patients in the Czech Republic reported recently [37]. However, it should be noted that the lack of association with other clinically important variables tested in our regression model including *IL28B* gene variation might be due to small sample size effect. Furthermore, there was a clear trend for association of upregulated baseline *BLVRA* expression in PBL of patients with favorable CC genotype as compared to both non CC ($p=0.059$) and TT *IL28B* ($p=0.058$) patients.

Induced *BLVRA* gene transcription in PBMC of uninfected chimpanzees in response to INF- α [38] and in INF- α treated PBMC [39] were previously reported. In accord with this data, *BLVRA* overexpression in our HCV-infected patients prior to and

during antiviral treatment seems to be due to *BLVRA* upregulation by INF- α . Moreover, our results showing an association of *BLVRA* in PBL with the treatment outcome are in agreement with substantially greater global induction of IFN-stimulated genes observed in the PBMC of treatment responders [40].

This data is in accord with our observation indicating that 1) SVR patients have increased *BLVRA* expression prior initiation of therapy (likely due to endogenous interferon induced by HCV infection); 2) both SVR and non-SVR patients have increased *BLVRA* expression during antiviral therapy (likely due to exogenous interferon administered therapeutically); 3) SVR patients after withdrawal of antiviral therapy have decreased expression of *BLVRA* to control values (likely due to decreased production of endogenous interferon, since HCV, as the major stimulus, is absent). It is also important to note, that *BLVRA* expression during HCV infection and antiviral therapy is independent of ribavirin-induced hemolysis. However, our data does not provide conclusive evidence whether *BLVRA* expression is involved actively in driving the treatment response, or is just a surrogate marker for treatment responsiveness.

In conclusion, our pilot results demonstrate that patients with chronic HCV infection significantly upregulate *BLVRA* expression in PBL, closely correlating with those in liver tissue. In addition, basal *BLVRA* expression in PBL is strongly associated with response to treatment. Finally, the lack of *BLVRA* overexpression is associated with non-responsiveness to standard antiviral therapy. Nevertheless, larger prospective studies are needed to confirm our data.

Author Contributions

Clinical data collection: KK PU. Revised the manuscript for important intellectual content: LM ML HJV TZ PU. Conceived and designed the experiments: IS LM ML TZ LV PU. Performed the experiments: IS OL MK. Analyzed the data: IS ML LV. Contributed reagents/materials/analysis tools: PU HJV. Wrote the paper: IS LV.

References

- Seef LB (1997) Natural history of hepatitis C. *Hepatology* 26: 21S–28S.
- World Health Organization: Hepatitis C. World Health Organization Fact sheet 164 (Revised June 2011). Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. Accessed 2012 Feb 4.
- Nemecsek V, Castkova J, Fritz P, Linhartova A, Svandova E, et al. (2003) The 2001 serological survey in the Czech Republic-viral hepatitis. *Cent Eur J Public Health* 11 Suppl: S54–61.
- Nemecsek V, Strunecky O (2009) Genotypic heterogeneity of hepatitis C virus (HCV) from blood donors in the Czech Republic. *Epidemiol Mikrobiol Immunol* 58: 63–72.
- Wang JT, Shou JC, Lin JT, Wang TH, Chen DS (1992) Detection of replicative form of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis* 166: 1167–1169.
- Peterhans E (1997) Reactive oxygen species and nitric oxide in viral diseases. *Biol Trace Elem Res* 56: 107–116.
- Okuda M, Li K, Beard MR, Showalter LA, Scholle F, et al. (2002) Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 122: 366–375.
- Abdalla MY, Britigan BE, Wen F, Icardi M, McCormick ML, et al. (2004) Down-regulation of heme oxygenase-1 by hepatitis C virus infection in vivo and by the in vitro expression of hepatitis C core protein. *J Infect Dis* 190: 1109–1118.
- Sass G, Seyfried S, M PS, Yamashita K, Kaczmarek E, et al. (2004) Cooperative effect of biliverdin and carbon monoxide on survival of mice in immune-mediated liver injury. *Hepatology* 40: 1128–1135.
- Verma A, Hirsch DJ, Glatz CE, Ronnett GV, Snyder SH (1993) Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* 259: 381–384.
- Vitek L, Schwertner HA (2007) The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Adv Clin Chem* 43: 1–57.
- Maines MD, Panahian N (2001) The heme oxygenase system and cellular defense mechanisms. Do HO-1 and HO-2 have different functions? *Adv Exp Med Biol* 502: 249–272.
- Willis D, Moore AR, Frederick R, Willoughby DA (1996) Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* 2: 87–90.
- Li L, Grenard P, Nhieu JT, Julien B, Mallat A, et al. (2003) Heme oxygenase-1 is an antifibrogenic protein in human hepatic myofibroblasts. *Gastroenterology* 125: 460–469.
- Sass G, Soares MC, Yamashita K, Seyfried S, Zimmermann WH, et al. (2003) Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice. *Hepatology* 38: 909–918.
- Zhu Z, Wilson AT, Mathias MM, Wen F, Brown KE, et al. (2008) Heme oxygenase-1 suppresses hepatitis C virus replication and increases resistance of hepatocytes to oxidant injury. *Hepatology* 48: 1430–1439.
- Ghaziani T, Shan Y, Lambrecht RW, Donohue SE, Pletschmann T, et al. (2006) HCV proteins increase expression of heme oxygenase-1 (HO-1) and decrease expression of Bcl-1 in human hepatoma cells. *J Hepatol* 45: 5–12.
- Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH (2002) Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16093–16098.
- Miralem T, Hu Z, Torno MD, Lelli KM, Maines MD (2005) Small interference RNA-mediated gene silencing of human biliverdin reductase, but not that of heme oxygenase-1, attenuates arsenite-mediated induction of the oxygenase and increases apoptosis in 293A kidney cells. *J Biol Chem* 280: 17084–17092.
- Florczyk UM, Jozkowicz A, Dulak J (2008) Biliverdin reductase: new features of an old enzyme and its potential therapeutic significance. *Pharmacol Rep* 60: 38–48.
- Ahmad Z, Salim M, Maines MD (2002) Human biliverdin reductase is a leucine zipper-like DNA-binding protein and functions in transcriptional activation of heme oxygenase-1 by oxidative stress. *J Biol Chem* 277: 9226–9232.
- Kravets A, Hu Z, Miralem T, Torno MD, Maines MD (2004) Biliverdin reductase, a novel regulator for induction of activating transcription factor-2 and heme oxygenase-1. *J Biol Chem* 279: 19916–19923.
- Ding B, Gibbs PE, Brookes PS, Maines MD (2011) The coordinated increased expression of biliverdin reductase and heme oxygenase-2 promotes cardiomyocyte survival: a reductase-based peptide counters beta-adrenergic receptor ligand-mediated cardiac dysfunction. *FASEB J* 25: 301–313.
- Yamaguchi T, Komoda Y, Nakajima H (1994) Biliverdin-IX alpha reductase and biliverdin-IX beta reductase from human liver. Purification and characterization. *J Biol Chem* 269: 24343–24348.
- Maines MD (2010) Potential application of biliverdin reductase and its fragments to modulate insulin/IGF-1/MAPK/PI3-K signaling pathways in therapeutic settings. *Curr Drug Targets* 11: 1586–1594.
- Lehmann E, El-Tantawy WH, Ocker M, Bartschlag R, Lohmann V, et al. (2010) The heme oxygenase 1 product biliverdin interferes with hepatitis C virus replication by increasing antiviral interferon response. *Hepatology* 51: 398–404.
- Huang C, Chen H, Cassidy W, Howell CD (2008) Peripheral blood gene expression profile associated with sustained virologic response after peginterferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis-C genotype 1. *J Natl Med Assoc* 100: 1425–1433.
- Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seef LB (2009) Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 49: 1335–1374.
- Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, et al. (1995) Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 22: 696–699.
- Carriere M, Pene V, Breiman A, Conti F, Chouzenoux S, et al. (2007) A novel, sensitive, and specific RT-PCR technique for quantitation of hepatitis C virus replication. *J Med Virol* 79: 155–160.
- Vreman HJ, Stevenson DK (1988) Detection of heme oxygenase activity by measurement of CO. In: Maines MD, Costa LG, Reed DJ, Sassa S, Sipes IG. *Current Protocols in Toxicology*. New York: John Wiley & Sons. 9.2.1–9.2.10.
- Zhu Z, Wilson AT, Luxon BA, Brown KE, Mathias MM, et al. (2010) Biliverdin inhibits hepatitis C virus nonstructural 3/4A protease activity: mechanism for the antiviral effects of heme oxygenase? *Hepatology* 52: 1897–1905.
- Wen F, Brown KE, Britigan BE, Schmidt WN (2008) Hepatitis C core protein inhibits induction of heme oxygenase-1 and sensitizes hepatocytes to cytotoxicity. *Cell Biol Toxicol* 24: 175–188.
- Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, et al. (2009) Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461: 399–401.
- Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Wilmann M, et al. (2009) IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 41: 1100–1104.
- Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, Ge D, Fellay J, et al. (2010) Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology* 139: 120–129.
- Frankova S, Bartakova R, Hejda V, Urbanek P, Husova L, et al. (2012) IL28 rs12979860 CC genotype slows progression of liver disease in HCV infected patients. *Gastroenterologie a Hepatologie* 66: S17.
- Lanford RE, Guerra B, Lee H, Chavez D, Brasky KM, et al. (2006) Genomic response to interferon-alpha in chimpanzees: implications of rapid downregulation for hepatitis C kinetics. *Hepatology* 43: 961–972.
- Waddell SJ, Popper SJ, Rubins KH, Griffiths MJ, Brown PO, et al. (2010) Dissecting interferon-induced transcriptional programs in human peripheral blood cells. *PLoS One* 5: e9753.
- He XS, Ji X, Hale MB, Cheung R, Ahmed A, et al. (2006) Global transcriptional response to interferon is a determinant of HCV treatment outcome and is modified by race. *Hepatology* 44: 352–359.

9 SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

9.1 Publikace týkající se tématu dizertační práce

9.1.1 Práce v časopisech s IF

Kubickova K, Subhanova I, Konickova R, Matousova L, Parobkova H, Kupec M, Pudil J, Urbanek P, Vitek L: Predictive role BLVRA mRNA expression in hepatocellular cancer. Annals of Hepatology 2016; 15(6): 881-887.

IF 1,68

Subhanova I, Muchova L, Lenicek M, Vreman HJ, Luksan O, **Kubickova K**, Kreidlova M, Zima T, Vitek L, Urbanek P: Expression of biliverdin reductase A in peripheral blood leukocytes is associated with treatment response in HCV-infected patients. PLOS ONE 2013; 8(3): e57555.

IF 4,09

9.1.2 Práce v časopisech bez IF

Kubíčková K, Hříbek P, Koula M, Urbánek P, Zavoral M, Lacman J, Parobková H, Tůma T: Screening hepatocelulárního karcinomu a kvalita surveillance v reálné praxi. Farmakoterapie 2019; 15(3): 384-389.

Kubala E, Žitňanská L, **Kubíčková K**, Hříbek P: Porovnání výsledků léčby HCC sorafenibem ve studii SHARP a v klinické praxi. Farmakoterapie 2019; 15(3): 390-392.

Urbánek P, Hříbek P, **Kubíčková K**: Hepatocelulární karcinom asociovaný s HBV a HCV infekcí: epidemiologie, etiologie a patogeneze. Postgraduální gastroenterologie & hepatologie 2017; 3(4): 249-256.

Hříbek P, **Kubíčková K**, Parobková H, Kaspříková N, Urbánek P: Prognostický význam ART skóre u pacientů s intermediárním hepatocelulárním karcinomem. Časopis lékařů českých 2016; 155(1): 52-55.

Kubíčková K, Urbánek P, Buřič I, Parobková H, Ryska M, Bělina F, Pudil J, Tesařová P, Kupec M: Hepatocelulární karcinom – naše zkušenosti se surveillance, efekt a komplikace transarteriální chemoembolizace. Gastroenterologie a hepatologie 2013; 67(6): 498-503.

Kubíčková K, Urbánek P, Zavoral M: Úskalí screeningu a diagnostiky hepatocelulárního karcinomu. Farmakoterapie 2012; 8: 5-7.

Hlavová K, Urbánek P, Zavoral M: Screening, diagnostika, klasifikace a terapie hepatocelulárního karcinomu. Farmakoterapie 2011; 7: 4-9.

9.1.3 Abstrakta v časopisech bez IF

Kubíčková K, Hříbek P, Urbánek P, Parobková H, Tůma T: Kvalita a efekt surveillance hepatocelulárního karcinomu v reálné praxi. Gastroenterologie a hepatologie 2019; 73(Suppl 1): 21-22.

Hříbek P, **Kubíčková K**, Lacman J, Tůma T, Parobková H, Koula M, Urbánek P: Transarteriální chemoembolizace středně pokročilého hepatocelulárního karcinomu – naše zkušenosti. Gastroenterologie a hepatologie 2019; 73(Suppl 1): 22.

Hříbek P, **Kubíčková K**, Koula M, Lacman J, Urbánek P: Transarteriální chemoembolizace jako vynucená iniciální terapie u časného hepatocelulárního karcinomu? Gastroenterologie a hepatologie 2018; 72(Suppl 1): 28.

Hříbek P, Parobková H, Koula M, **Kubíčková K**, Urbánek P: Terapie hepatocelulárního karcinomu v reálné praxi – když to nejde podle pravidel? Gastroenterologie a hepatologie 2017; 71(Suppl 1): 25-26.

Hříbek P, **Kubíčková K**, Parobková H, Urbánek P, Zavoral M: Rozdíly v celkovém přežití pacientů s HCC v rámci stadia B dle BCLC klasifikace. Gastroenterologie a hepatologie. 2015; 69(Suppl 1): 10-11.

Kubíčková K, Hříbek P, Urbánek P, Parobková H, Zavoral M: Efekt transarteriální chemoembolizace u pacientů s hepatocelulárním karcinomem dispenzarizovaných a léčených v ÚVN Praha. Gastroenterologie a hepatologie. 2014; 68(Suppl 1): 20.

Subhanová I, Matoušová I, **Kubíčková K**: Asociace TT genotypu IL28B rs 12979860 se sníženou indukcí mRNA biliverdinreduktázy A v periferních leukocytech pacientů s chronickou hepatitidou C. Gastroenterologie a hepatologie. 2014; 68(Suppl 1): 40.

Kubíčková K, Urbánek P, Buřič I, Parobková H, Zavoral M: Efekt a komplikace transarteriální chemoembolizace u pacientů s hepatocelulárním karcinomem. Gastroenterologie a hepatologie 2013; 67(Suppl. 1): 18.

Subhanová I, **Kubíčková K**, Urbánek P, Houbová B, Zima T, Vitek L: Hemolytická anémie u HCV infekce při léčbě ribavirinem nemá vliv na změny exprese enzymů katabolické dráhy hemu. Gastroenterologie a hepatologie 2013; 67(Suppl. 1): 25.

Hlavová K, Urbánek P, Buřič I, Parobková H, Ryska M, Bělina F, Pudil J, Tesařová P, Zavoral M: Základní charakteristiky kohorty pacientů s hepatocelulárním karcinomem sledovaných v ÚVN Praha a ve VFN v Praze v letech 2006-2012. Gastroenterologie a hepatologie 2012; 66(Suppl): 16-17.

9.2 Publikace týkající se jiných témat

9.2.1 Práce v časopisech s IF

Martinek J, **Hlavova K**, Zavada F, Seifert B, Rejchrt S, Urban O, Zavoral M: "A surviving myth"--corticosteroids are still considered ulcerogenic by a majority of physicians. Scandinavian Journal of Gastroenterology 2010; 45(10): 1156-61.

IF 1,97